

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
Geschäftsführender Direktor Prof. Dr. Ralf Kinscherf

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Veränderungen des Skelettmuskels bei Tumorkachexie

**Morphologische, metabolische und Genexpressions- Analyse
des humanen Musculus rectus abdominis**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

Dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

Johanna Serena Rockenbach aus Gießen

Marburg, 2020

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 20.05.2020

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Prof. Dr. Ralf Kinscherf

1. Korreferent: Prof. Dr. Oliver Rick

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	I
-----------------------------------	----------

TABELLENVERZEICHNIS.....	III
---------------------------------	------------

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	V
-----------------------------------	----------

1. EINLEITUNG	1
----------------------------	----------

1.1. DEFINITION DER KACHEXIE BEI TUMOREN UND ANDEREN ERKRANKUNGEN	1
---	---

1.2. KLINISCHE BEDEUTUNG DER TUMORKACHEXIE	2
--	---

1.3. PANKREASKARZINOM	3
-----------------------------	---

1.4. SKELETTMUSKEL.....	4
-------------------------	---

1.5. MORPHOLOGIE DES SKELETTMUSKELS BEI TUMORKACHEXIE	7
---	---

1.6. PROTEINMETABOLISMUS / -UMSATZ BEI TUMORKACHEXIE	9
--	---

1.6.1. Proteinsynthese.....	10
-----------------------------	----

1.6.2. Mögliche Mechanismen und Signalwege der kachexieassoziierten Proteolyse	11
---	----

1.7. MEDIATOREN DER TUMORKACHEXIE	16
---	----

1.7.1. Systemische proinflammatorische Mediatoren	16
---	----

1.7.2. Katabole Regulatoren der Muskelmasse.....	19
--	----

1.7.3. Andere zirkulierende Mediatoren	21
--	----

1.8. GLUKOSESTOFFWECHSEL UND INSULINRESISTENZ BEI TUMORKACHEXIE.....	22
--	----

1.9. MONOAMINOOXIDASE A UND B	23
-------------------------------------	----

1.10. FETTSTOFFWECHSEL UND LIPOLYSE BEI TUMORKACHEXIE	24
---	----

1.11. AMINOSÄUREMETABOLISMUS BEI TUMORKACHEXIE	24
--	----

1.12. PHARMAKOLOGISCHE BEHANDLUNGSMÖGLICHKEITEN DER TUMORKACHEXIE	28
---	----

1.13. FRAGESTELLUNG UND ZIEL DER ARBEIT	29
---	----

2. MATERIALIEN UND METHODEN	31
--	-----------

2.1.	MATERIALIEN	31
2.1.1.	Antikörper	31
2.1.2.	Primer	31
2.1.3.	Verwendete Kits	33
2.1.4.	Reagenzien.....	34
2.1.5.	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	36
2.1.6.	Software	39
2.2.	METHODEN	40
2.2.1.	Klinische Kooperationspartner	40
2.2.2.	Ethikanträge und Patientenrekrutierung	40
2.2.3.	Gewebeproben	41
2.2.4.	Kryoschnitte.....	43
2.2.5.	(Immun-) histologische Färbungen	43
2.2.6.	Aminosäureanalyse (ASA).....	54
2.2.7.	Genexpressionsanalyse anhand qRT-PCR	56
2.2.8.	Protein-Array	67
2.2.9.	Statistische Auswertung der Patientendaten und Messergebnisse	71
3.	ERGEBNISSE	74
3.1.	PATIENTENDATEN	74
3.2.	(IMMUN-) HISTOCHEMIE.....	76
3.2.1.	Fasergröße	76
3.2.2.	Faserdichte	77
3.2.3.	Faserkomposition	78
3.2.4.	Anteil der Muskelfaserfläche an der Gesamtfläche	79

3.2.5.	Kapillarkontakte.....	80
3.2.6.	Kapillardichte.....	82
3.2.7.	Faserfläche pro Kapillarkontakt.....	83
3.2.8.	Zentralisierte Zellkerne.....	84
3.3.	AMINOSÄUREANALYSE	86
3.3.1.	Essentielle Aminosäuren	86
3.3.2.	Nicht essentielle Aminosäuren.....	88
3.3.3.	Weitere Aminosäuren	89
3.4.	GENEXPRESSION ANHAND QRT-PCR	90
3.4.1.	Housekeeping-Gene	90
3.4.2.	Apoptose.....	91
3.4.3.	Entzündung.....	91
3.4.4.	Zytokine	92
3.4.5.	Glutathionstoffwechsel	92
3.4.1.	MAO als eine Quelle von oxidativem Stress.....	93
3.4.2.	Myogenese	94
3.4.3.	Proteosomale Aktivität.....	94
3.4.4.	Aminosäure- Transporter	94
3.4.5.	Angiogenese	95
3.5.	PROTEIN-ARRAY	96
3.5.1.	Apoptose.....	96
3.5.2.	Proteasomale Aktivität und Myogenese	97
3.5.3.	Pro-Inflammation	98
3.5.4.	Anti-Inflammation	100

3.5.5. Angiogenese	101
3.5.6. Anti-Angiogenese	102
4. DISKUSSION	103
4.1. LIMITATIONEN	103
4.1.1. Patientenkollektiv	103
4.1.2. Ein-/ Ausschlusskriterien	104
4.1.3. Gewebeproben	105
4.2. (IMMUN-) HISTOCHEMIE	107
4.2.1. Morphometrie und Faserkomposition	107
4.2.2. Kapillarkontakte und -dichte	110
4.2.3. Zentralisierte Zellkerne	112
4.3. INTRAZELLULÄRE AMINOSÄUREKONZENTRATION	115
4.3.1. Leucin	115
4.3.2. Isoleucin und Valin	119
4.3.3. Threonin	120
4.3.4. Aspartat	120
4.3.5. Glutathion-Vorläufer: Glycin, Glutaminsäure und Cystein	121
4.3.6. Carnosin-Vorläufer: Histidin und β -Alanin	123
4.4. GENEXPRESSION ANHAND QRT-PCR UND PROTEIN-ARRAY	124
4.4.1. Apoptose	124
4.4.2. Proteosomale Aktivität	125
4.4.3. Myogenese	126
4.4.4. Inflammation	128
4.4.1. MAOA und MAOB	132

4.4.2. Angiogenese	133
5. ZUSAMMENFASSUNG	135
6. SUMMARY	137
7. LITERATURVERZEICHNIS.....	X
8. ANHANG.....	XXVIII
8.1. VOLLSTÄNDIGE ERGEBNISSE	XXVIII
9. VERZEICHNIS MEINER AKADEMISCHEN LEHRER.....	XLI

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1:	Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2012 (Kaatsch et al. 2015).....	3
Abb. 2:	Proteinumsatz bei Tumorkachexie im Muskel (Modifiziert nach Johns et al. 2013).	13
Abb. 3:	Schema der ABC-Technik (Modifiziert nach Mulisch und Welsch 2015).....	49
Abb. 4:	Exemplarische CD31 Färbung und Auswertung (Probe: HD 805-2).	52
Abb. 5:	Exemplarische ATPase Färbung und Auswertung (Probe: HD 805-2).	53
Abb. 6:	Exemplarische CD31 und ATPase Färbung (Probe HD805-2 gleicher Ausschnitt in zwei Färbungen).	53
Abb. 7:	Beispiel der RIN-Qualität von 3 Proben im Elektropherogramm (FU = Fluoreszenz).	60
Abb. 8:	Exemplarische VEGFB qRT-PCR aller Gewebeproben.	66
Abb. 9:	Proteom Profiler Auswertung. Von links nach rechts 3 Array-Membranen mit folgenden Probenpools:	71
Abb. 10:	Mittlere Muskelfaserfläche [μm^2].	76
Abb. 11:	Faserdichte [Anzahl Fasern/ mm^2 Gesamtfläche].	77
Abb. 12:	Faserkomposition [%].	78
Abb. 13:	Anteil der Muskelfaserfläche an der Gesamtfläche.	79
Abb. 14:	Mittlere Anzahl Kapillarkontakte.....	81
Abb. 15:	Korrelation der mittleren Anzahl Kapillarkontakte mit der mittleren Fasergröße [μm^2].	81
Abb. 16:	Kapillardichte [Anzahl/ mm^2].	82
Abb. 17:	Faserfläche pro Kapillarkontakt [μm^2].	83
Abb. 18:	Prozentuale Anteil der Fasern mit zentralisierten Zellkernen an allen Fasern, von Fasertyp I, IIa oder IIx [%].	85
Abb. 19:	Korrelation zwischen Gewichtsverlusts [%] und dem prozentualen Anteil aller Fasern mit zentralisierten Zellkernen an Gesamtzahl der Fasern [%].	85

Abb. 20: Intrazelluläre Aminosäurekonzentration [nmol/mg] von (A) Leucin, (B) Threonin und (C) Histidin.	87
Abb. 21: Korrelationen von (A) Leucin mit Gewichtsverlust [%] und (B) Leucin mit rel. Genexpression von <i>TRIM63</i> [x-fach].....	87
Abb. 22: Intrazelluläre Aminosäurekonzentration [nmol/mg] von (A) Aspartat und (B) Glycin.	89
Abb. 23: Relative Genexpression von <i>BCL2</i> [x-fach].	91
Abb. 24: Relative Genexpression von <i>CD68</i> [x-fach].....	92
Abb. 25: Relative Genexpression [x-fach] von (A) <i>GCS</i> und (B) <i>GSR</i>	93
Abb. 26: Relative Genexpression [x-fach] von (A) <i>MAOA</i> und (B) <i>MAOB</i>	93
Abb. 27: Relative Genexpression von <i>SNAT2</i> [x-fach].....	95
Abb. 28: Korrelation der relativen Genexpression von LAT1 mit der von SNAT2 (x-fach).	95
Abb. 29: Relative Proteinexpression des Fas-Liganden.	96
Abb. 30: Relative Proteinexpression von (A) MMP9, (B) IL15 und (C) SERPINE1.....	97
Abb. 31: Relative Proteinexpression von (A) IL1B, (B) IL6, (C) IL8 , (D) IL32 $\alpha/\beta/\gamma$ (E) CRP, (F) TNF, (G) Interferon- γ und (H) EGF.	99
Abb. 32: Relative Proteinexpression von (A) GDF15 und (B) TNFSF13B.	100
Abb. 33: Relative Proteinexpression von (A) IL4, (B) IL10 und (C) IL13.....	101
Abb. 34: Relative Proteinexpression von (A) VEGF, (B) ANGPT1 und (C) ANGPT2.	102
Abb. 35: Relative Proteinexpression von PF4.	102
Abb. 36: Transmembranärer Transport von Glutamin und Leucin im Skelettmuskel (Modifiziert nach Dodd und Tee 2012).....	116

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1:	Vergleich der Skelettmuskelfasertypen des Menschen.	6
Tab. 2:	Gruppengrößen bezüglich der angewendeten Methoden.....	42
Tab. 3:	qRT-PCR: Temperaturprofil.....	62
Tab. 4:	Auflistung der untersuchten Primer für die Expressionsanalyse.	64
Tab. 5:	Anthropometrische Daten, UICC-Stadien, Alkohol- , Nikotinkonsum und Medikamenteneinnahme.	75
Tab. 6:	Ergebnisse der Untersuchung auf das stabilste Housekeeping-Gen mit der Software Normfinder.xla	90
Tab. 7:	Vergleich der histologischen Studienergebnisse. Ohne / mit Kachexie.	109
Tab. 8:	Zusammenfassende Darstellung der pro- und antiinflammatorischen Mediatoren.	128
Tab. 9:	Mittlere Muskelfaserfläche [μm^2].	XXVIII
Tab. 10:	Faserdichte [Anzahl Fasern/ mm^2 Gesamtfläche].	XXVIII
Tab. 11:	Faserkomposition [%].	XXIX
Tab. 12:	Anteil der Muskelfaserfläche an der Gesamtfläche [%].	XXIX
Tab. 13:	Kapillarkontakte.....	XXX
Tab. 14:	Kapillardichte [Anzahl/ mm^2].	XXX
Tab. 15:	Faserfläche pro Kapillarkontakt [μm^2].	XXXI
Tab. 16:	Prozentuale Anteil der Fasern mit zentralisierten Zellkernen an allen Fasern, an Fasertyp I, IIa oder IIx [%].	XXXI
Tab. 17:	Prozentuale Anteil der Fasern des Fasertyps I, IIa, IIx mit zentralisierten Zellkernen an allen ausgewerteten Fasern [%].	XXXII
Tab. 18:	Prozentuale Anteil der Fasern des Fasertyps I, IIa, IIx mit zentralisierten Zellkernen an allen Fasern mit zentralisierten Zellkernen [%].	XXXII
Tab. 19:	Auswertung ASA [nmol/mg].	XXXIII
Tab. 20:	Auswertung relative Genexpression [x-fach].	XXXIV

Tab. 21: Protein-Array Auswertung.....	XXXVI
Tab. 22: Korrelationen.....	XL

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	<i>Grad Celcius</i>
ACTB	<i>Actin beta</i>
AK	<i>Antikörper</i>
Akt1	<i>Akt Serin/Threonin kinase; Syn.: PKB</i>
AMPK	<i>Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase</i>
ANGPT1	<i>Angiopoietin 1</i>
APP	<i>Akute-Phase-Proteine</i>
Aqua u.p.	<i>ultrapure Aqua</i>
ASA	<i>Aminosäureanalyse</i>
ATPase	<i>Adenosintriphosphatase</i>
B	<i>Bestimmtheitsmaß</i>
Bax	<i>BCL2 associated X protein</i>
Bcl	<i>B-cell lymphoma</i>
CASP3	<i>Caspase 3</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CRP	<i>C-reaktives Protein</i>
C _t	<i>threshold cycle</i>
DAB	<i>3–3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid</i>
dest.	<i>destillata</i>
DNA	<i>Desoxyribonukleinsäure; engl.: deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	<i>Desoxyribonukleosidtriphosphat</i>
dT	<i>Desoxythymidin</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>

FBXO32	<i>F-box protein 32; Syn.: ATROGIN1, MAFBX</i>
Foxo1	<i>Forkhead box O1</i>
g	<i>Gramm</i>
GCS	<i>Gamma-Glutamylcystein Synthetase</i>
GLUT4	<i>Glukose-Transporter 4</i>
GSR	<i>Glutathion-Disulfid Reduktase</i>
H.E.	<i>Hämatoxylin-Eosin</i>
HLPC	<i>Hochleistungsflüssigkeitschromatographie</i>
HMB	<i>β -Hydroxy β -Methylbutyrat</i>
IFNG	<i>Interferon gamma</i>
Igf1	<i>Insulin like growth factor 1</i>
IL1	<i>Interleukin 1</i>
IL6	<i>Interleukin 6</i>
IQR	<i>Interquartile range</i>
JAK	<i>Januskinase</i>
Kap.	<i>Kapitel</i>
KDR	<i>Kinase insert domain receptor; Syn.: VEGFR2</i>
l	<i>Liter</i>
LAT1	<i>L-Typ Amino Acid Transporter 1; Syn.: SLC7A5</i>
LAT2	<i>L-Type Amino Acid Transporter 2; Syn.: SLC7A8</i>
M	<i>molar</i>
M.	<i>Musculus</i>
M. rect. abd.	<i>Musculus rectus abdominis</i>
M. vast. lat.	<i>Musculus vastus lateralis</i>
MAO	<i>Monoaminoxidase</i>
ME	<i>Median</i>

MHC	<i>Myosin heavy chain</i>
min	<i>Minuten</i>
ml	<i>Milliliter</i>
MMP9	<i>Matrix metalloproteinase 9</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MSTN	<i>Myostatin; Syn.: GDF8</i>
MTOR	<i>Mechanistic target of rapamycin</i>
Myod1	<i>Myogenic differentiation 1</i>
N	<i>Gruppengröße; Anzahl Proben</i>
NFκB	<i>Nuclear factor kappa B subunit 1</i>
NOS	<i>Stickstoffmonoxid-Synthase</i>
Pax7	<i>Paired box 7</i>
PBS	<i>Phosphatgepufferte Salzlösung</i>
PDPK1	<i>3-phosphoinositide dependent protein kinase 1</i>
PF4	<i>Platelet Factor 4</i>
PI3K	<i>Phosphoinositid-3-Kinase</i>
PIP ₂	<i>Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat</i>
PIP ₃	<i>Phosphatidylinositol-3, 4, 5-Triphosphat</i>
PPARGC1A	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha; Syn.: PGC 1 alpha</i>
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin Homolog</i>
PTGS2	<i>Prostaglandin-endoperoxide synthase 2; Syn.: COX2</i>
qRT-PCR	<i>quantitative Echtzeit-Reverse-Transkription-Polymerasekettenreaktion</i>
r	<i>Korrelationskoeffizienten</i>
RNA	<i>Ribonukleinsäure</i>
RPLP0	<i>Ribosomal protein lateral stalk subunit P0</i>

RPS6KB1	<i>Ribosomale protein S6 kinase B1</i>
rRNA	ribosomale RNA
RT	<i>Raumtemperatur</i>
SD	<i>Standardabweichung</i>
SEM	<i>Standardfehler des Mittelwertes</i>
SERPINE1	<i>Serpin family E member 1</i>
SNAT	<i>Sodium coupled neutral amino acid transporter</i>
SOCS3	<i>Suppressor of cytokine signaling 3</i>
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
Syn	<i>Synonym</i>
Tbl	Tablette
TBP	<i>TATA-box binding protein</i>
TGFB	<i>Transforming growth factor beta</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFSF13B	<i>TNF superfamily member 13b; Syn.: BAFF</i>
TRIM63	<i>Tripartite motif containing 63; Syn.: MURF1</i>
Tu+K-	<i>Pankreastumor mit <10% Gewichtsverlust in 6 Monaten</i>
Tu+K-/+	<i>Pankreastumor und 5-10% Gewichtsverlust in 6 Monaten</i>
Tu+K+	<i>Pankreastumor und Kachexie mit >10% Gewichtsverlust in 6 Monaten</i>
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling</i>
UICC	<i>Union Internationale contre le Cancer</i>
U-Test	<i>Wilcoxon-Mann-Whitney-Test</i>
VEGFA	<i>Vascular endothelial growth factor A</i>
VEGFB	<i>Vascular endothelial growth factor B</i>
\bar{x}	<i>arithmetischer Mittelwert</i>
μm	<i>Mikrometer</i>

Anmerkung: Im gesamten Text wird die allgemeingültige Nomenklatur der Gene und Proteine angewendet: Gennamen sind kursiv und Proteinnamen normal, nicht kursiv gesetzt. Im Mausmodell werden Gene und Proteinnamen mit einem Großbuchstaben gefolgt von Kleinbuchstaben geschrieben. Humane Gene und Proteine werden nur mit Großbuchstaben geschrieben.

1. EINLEITUNG

1.1. Definition der Kachexie bei Tumoren und anderen Erkrankungen

Kachexie, aus dem Griechischen von κακός = „kakos“ und ἥξις = „hexis“ abgeleitet, bedeutet „schlechter Zustand“ (Dornblüth und Pschyrembel 2004, S. 899; Alexiou-Puljer 2008).

Im Rahmen der „Cachexia Consensus Conference“ wurde 2006 Kachexie, nach langem Fehlen einer einheitlichen Definition, klinisch als ein ungewollter Gewichtsverlust von mindestens 5% innerhalb von 12 Monaten in Assoziation mit einer zugrundeliegenden chronischen Erkrankung bei Erwachsenen definiert (Evans et al. 2008). Der Gewichtsverlust bei Kachexie basiert auf einer Abnahme der Muskelmasse mit oder ohne Körperfettverlust, ohne dass dieser durch alleinige Nahrungsaufnahme vollständig behoben werden kann und führt zu einer fortschreitenden funktionellen Einschränkung (Argilés et al. 1997; Evans et al. 2008; Fearon et al. 2011; Johns et al. 2013). Kachexie wird bei vielen chronischen Erkrankungen, wie Infektionen, AIDS, kongestive Herzinsuffizienz, rheumatoider Arthritis, Tuberkulose, zystische Fibrose, Morbus Crohn oder Tumorerkrankungen beobachtet (Tisdale 2002). Dabei müssen mindestens drei der folgenden Kriterien zutreffen: Verminderte Muskelkraft, Fatigue, Anorexie, geringer Fettfreie-Masse-Index und abnormale Laborwerte (erhöhte Entzündungswerte, Anämie oder erniedrigtes Serumalbumin). Des Weiteren wurde die Kachexie in leicht (>5% Gewichtsverlust), moderat (>10%) und schwerwiegend (>15%) eingeteilt. Entsprechend dieser Definition wird z.B. eine Muskelmassenabnahme ohne Gewichtsverlust bei älteren Menschen nicht als Kachexie sondern als „Sarkopenie“ bezeichnet (Evans et al. 2008).

Dennoch variiert in klinischen Studien die Definition der Kachexie immer noch zwischen 2% und 20% Gewichtsverlust in Zeiträumen von zwei bis sechs Monaten (Blum et al. 2010). Eine häufig verwendete, sinnvolle Grenze zur Definition einer vorliegenden Kachexie scheint bei einem moderaten Gewichtsverlust von 10% in 6 Monaten zu liegen (Martignoni et al. 2005; Gordon et al. 2005; Weber et al. 2007; Bachmann et al. 2008; Weber et al. 2009; Fearon et al. 2011).

Allgemein manifestiert sich Kachexie also als Gewichtsverlust mit Muskelmassenverlust bzw. -atrophie und ist häufig mit Anorexie, Anämie und Veränderungen im Kohlenhydrat-, Lipid- und Proteinstoffwechsel assoziiert (Argilés et al. 1997). Inaktivität, Malnutrition und therapeutische Interventionen tragen nur zu einem kleinen Anteil zur Kachexie bei (Johns et al. 2013).

Die Tumorkachexie stellt ein komplexes multifaktorielles Syndrom als Folge vieler Veränderungen in den metabolischen Signalwegen (s. Kap. 1.6 und 1.7), in Geweben und Organen dar (Dhanapal et al. 2011; Argilés et al. 2014). Letztlich sind die Ursachen und die Mechanismen, die zur Tumorkachexie führen, noch wenig verstanden (Evans et al. 2008; Mondello et al. 2014).

1.2. Klinische Bedeutung der Tumorkachexie

Die Tumorkachexie ist von hoher klinischer Bedeutung: 20% aller Karzinompatienten versterben an der Tumorkachexie (Warren 1932; Tisdale 2002). Dabei führt der progressive Muskelverlust oft zu einer Funktionseinschränkung bis hin zum Versagen der Atemmuskulatur (Bachmann et al. 2009; Dhanapal et al. 2011). Prognose verschlechternd ist die geringere Ansprechrate auf Chemotherapie bei kachektischen Patienten (Dewys et al. 1980). Zugleich korreliert der Grad der Kachexie negativ mit der Lebensqualität und dem Überleben des Tumorpatienten (Nixon et al. 1980; Lelbach et al. 2007; Bachmann et al. 2008; Burckart et al. 2010). Derzeit sind wenige gezielte Therapieansätze etablierte. Für wirksame neue Therapieansätze ist eine Aufklärung der komplexen Mechanismen des Muskelschwundes dringend erforderlich.

Bisher gibt es sowohl auf der deskriptiven als auch auf der molekularen Ebene nur wenige Daten zur Kachexie, die auf Studien mit humanen Gewebeproben beruhen (Johns et al. 2013). Die Mehrzahl der Studien basieren auf Mausmodellen, die jedoch eine große Divergenz zur Tumorkachexie bei Menschen bezüglich Morphologie, Mediatoren und Mechanismen zeigen (Johns et al. 2013). Mausmodelle entwickeln eine rapide Kachexie mit relativ akuter Muskelatrophie, wohingegen beim Mensch ein chronischer Muskelschwund beobachtet wird (Johns et al. 2013). Zudem entspricht die Tumorinokulation mit großer Tumormasse bezogen auf das Gewicht der Mäuse nicht

der klinischen Situation von Patienten z.B. mit Pankreaskarzinom. Somit ist eine Übertragbarkeit von Mausmodellen auf den Menschen nur eingeschränkt möglich und es erscheint dringlich klinische Studien voranzutreiben.

1.3. Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom ist ein bösartiger Tumor der Bauchspeicheldrüse. Von allen Tumorpatienten leiden Patienten mit Pankreas- oder Magenkarzinom mit 83-87% am häufigsten unter Gewichtsverlust. Ein Drittel dieser Patienten verlieren dabei über 10% ihres ursprünglichen Körpergewichts (Dewys et al. 1980) und sind somit kachektisch. Insgesamt stellt das Pankreaskarzinom die vierthäufigste Krebstodesursache dar (Kaatsch et al. 2015). Im Jahr 2012 stand es bei der Frau an 6. und beim Mann an 10. Stelle in der Statistik der häufigsten Tumorlokalisationen in Deutschland und gehört somit auch zu den häufigsten Tumorleiden des Menschen (Abb. 1) (Kaatsch et al. 2015).

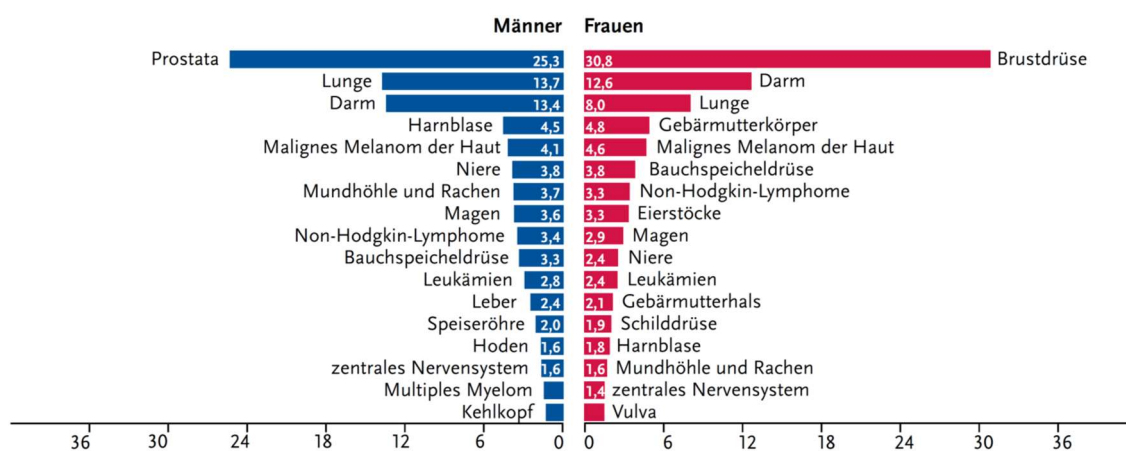


Abb. 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2012 (Kaatsch et al. 2015).

Die Inzidenz des Pankreaskarzinoms in Deutschland beträgt ca. 10/100.000 Einwohner pro Jahr (Kaatsch et al. 2015), dessen häufigste histopathologische Entität das duktales Adenokarzinom ist (Fitzgerald et al. 2008; Gallmeier und Gress 2018). Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Männer bei 71 und für Frauen bei 75 Jahren (Kaatsch et al. 2015). Da das Pankreaskarzinom anfänglich keine oder nur wenige Symptome

verursacht, wird es oftmals erst spät erkannt. Aus diesem Grund liegen bei Diagnosestellung oft bereits Kachexie, Fernmetastasen vor oder es besteht eine lokale Inoperabilität. Wenn keine Gefäßinvasion oder Fernmetastasen vorliegen, kann der Tumor chirurgisch reseziert werden. Hierzu wird entweder eine subtotale Duodenopankreatektomie mit Lymphadenektomie, eine Operationsmethode nach Kausch und Whipple (Kausch 1912; Whipple et al. 1935), oder eine weniger radikale Pylorus erhaltende partielle Duodenopankreatektomie durchgeführt. Wenn der Tumor im Pankreaskorpus oder –schwanz liegt, ist eine Pankreaslinksresektion mit Splenektomie indiziert. Adjuvant wird meistens Gemcitabin oder 5-Fluorouracil als Chemotherapeutikum verabreicht (Gallmeier und Gress 2018).

Auf Grund der oben genannten oftmals späten Diagnosestellung liegt die relative 5-Jahres-Überlebensrate bei 9% (Siegel et al. 2019). Das Pankreaskarzinom weist damit die niedrigste Überlebensrate unter allen Krebserkrankungen auf (Kaatsch et al. 2015).

Risikofaktoren für eine Neuerkrankung am Pankreaskarzinom sind Tabakkonsum, Adipositas, Diabetes mellitus Typ 2, hoher Konsum von verarbeiteten Fleischwaren, Alkohol sowie chronische Pankreatitis (Kaatsch et al. 2015; Baenkler et al. 2015).

1.4. Skelettmuskel

Um erfolgsversprechende Therapieansätze gegen die Tumorkachexie entwickeln zu können, gilt es die molekularen Grundlagen der Kachexie insbesondere des betroffenen Skelettmuskels weiter aufzuklären. Im Folgenden soll dazu ein kurzer Überblick über die wichtigsten Struktureinheiten des Skelettmuskels gegeben werden.

Der Skelettmuskel gehört mit der Herzmuskulatur zur quergestreiften Muskulatur. Er ist umgeben von einer Faszie mit straffen Bindegewebe und dem darunter liegenden lockerem Bindegewebe, dem Epimysium. Die Muskelbündel sind durch Perimysium voneinander abgegrenzt. Ein Muskelbündel wird aus vielen bis zu mehreren Zentimetern lang gestreckten Muskelfasern gebildet, welche jeweils von Endomysium umgeben sind (Lüllmann-Rauch und Asan 2019, S. 269).

Die Muskelfasern haben viele longitudinal ausgerichtete, direkt unter der Plasmamembran (=Sarkolemm) liegende Zellkerne. Diese entstehen durch die Fusion vieler einkerniger Myoblasten während der Entwicklung, sowie bei Reparaturvorgängen. Die Muskelfaserkerne selbst sind nicht mehr teilungsfähig, dennoch gilt der Skelettmuskel als bedingt regenerationsfähig, da sich bei Bedarf Satellitenzellen (ehemals Myoblasten), welche unter der Basalmembran angelagert sind, teilen und die Tochterzellen mit der Muskelfaser verschmelzen können (Ulfig 2015, S. 64–65; Lüllmann-Rauch und Asan 2019, S. 269).

Im Zytoplasma der Muskelfaser finden sich hauptsächlich Myofibrillen und dazwischen liegende Mitochondrien, sowie das sarkoplasmatisches Retikulum, welches Ca^{2+} für die Kontraktion freisetzt und danach wieder aufnimmt (Lüllmann-Rauch und Asan 2019, S. 276–277).

Die Kontraktion des Skelettmuskels wird durch die kleinste kontraktile Einheit des Skelettmuskels, dem Sarkomer, ermöglicht. Mehrere hintereinander geschaltete Sarkomere bilden eine Muskelfibrille, welche hauptsächlich aus Aktin- und Myosinfilamenten besteht. Diese gleiten während der Muskelkontraktion ineinander, wodurch sich das Sarkomer verkürzt (Lüllmann-Rauch und Asan 2019, S. 270–277). Die Aktin-Myosin-Interaktion ist Ca^{2+} -abhängig durch den Troponin-Komplex und Tropomyosin reguliert (Weber und Murray 1973). Myosin ist der molekulare Motor, welches mit seiner ATPase-Aktivität durch Spaltung des ATPs mechanische Energie gewinnt. Es besteht aus zwei schweren Peptidketten (Myosin heavy chain; MHC), die das kontraktile Verhalten und den Muskelfasertyp bestimmen und vier leichten Peptidketten (Lüllmann-Rauch und Asan 2019, 40, 281). Zu den Intermediärfilamenten gehört u.a. Desmin, welches die Myofibrillen untereinander verspannt und für die Aufrechterhaltung der mechanischen Stabilität wichtig ist (Clark et al. 2002). Weitere Filament-Typen sind Titin und Nebulin, welche als Stabilisatoren wirken und die Ordnung im Sarkomer sicherstellen (Lüllmann-Rauch und Asan 2019, S. 272).

Es werden hauptsächlich drei Muskelfasertypen unterschieden: Der langsame Typ I, der schnelle Typ IIa und der am schnellsten kontrahierende Muskelfasertyp IIx, sowie deren

Hybrid-Typen (Tab. 1) (Schmidt et al. 2011, S. 100–115). Der humane Muskelfasertyp IIx entspricht im Tiermodell in etwa dem Muskelfasertyp IIb (Smerdu et al. 1994).

Die Funktion des Muskels ist abhängig von dem am häufigsten vorkommenden Muskelfasertyp (Schmidt et al. 2011, S. 115). Fasertyp I hat einen oxidativen Stoffwechsel und ist mit vielen Mitochondrien ausgestattet, wodurch er eher ermüdungsresistent ist. Aufgrund der hohen Kapillardichte des Fasertyps I und des hohen Myoglobingehaltes, welches für den intramuskulären Sauerstofftransport verantwortlich ist, erscheint der Muskel makroskopisch bei Dominanz des Fasertyps I rot. Im Gegensatz dazu ist Fasertyp IIx für eine schnelle Bewegung zuständig und eher mitochondrienarm, glykolytisch arbeitend und somit leicht ermüdbar (Lüllmann-Rauch und Asan 2019, S. 281).

Tab. 1: Vergleich der Skelettmuskelfasertypen des Menschen.
(Gekle et al. 2015; Schmidt et al. 2011, S. 115; Silverthorn 2009)

Muskelfasertyp / MHC-Isoform	Typ I	Typ IIa	Typ IIx
Zuckungsgeschwindigkeit	langsam	schnell	schnell
Ermüdbarkeit	resistent	resistent	schnell
Myoglobin	viel (rot)	mittel (rot)	wenig (weiß)
Stoffwechsel	oxidativ	oxidativ, begrenzt glykolytisch	glykolytisch
Kapillardichte	hoch	mittel	gering
Mitochondrien	viel	sehr viel	wenig
Myosin-ATPase Aktivität	niedrig	mittel	hoch
Myosin	MHC I	MHC IIa	MHC IIx

Der in dieser Arbeit untersuchte Musculus rectus abdominis (M. rect. abd.) gehört zur vorderen Bauchmuskulatur und ist vor allem für die aufrechte Körperhaltung, die

Bauchpresse und das Vorbeugen verantwortlich. Die oben genannten drei Fasertypen liegen in diesem Muskel mosaikartig nebeneinander vor. Fasertyp I und IIa sind die häufigsten Fasertypen mit der größten Einzel- und Gesamtfaserfläche, seltener ist der Fasertyp IIx (Sciote et al. 1994). Somit ist der M. rect. abd. entsprechend seiner Haltefunktion als relativ ermüdungsresistent zu bezeichnen.

1.5. Morphologie des Skelettmuskels bei Tumorkachexie

Die Hauptmanifestation der Kachexie ist der Muskelschwund (Johns et al. 2013). Dieser kann durch Apoptose, Nekrose, Hypoplasie (Synonym: numerische Atrophie) oder Hypotrophie (Synonym: einfache Atrophie) der Muskelfasern entstehen. Apoptose ist ein physiologischer Vorgang, bei dem durch einen programmierten Zelltod eine einzelne Zelle nach Schrumpfung untergeht. Im Gegensatz dazu wird der Zelltod durch Nekrose meist von äußeren Faktoren z.B. Noxen ausgelöst und betrifft zumeist einen ganzen Zellverbund, indem die Zellen zunächst anschwellen und danach zugrunde gehen. Bei der Hypotrophie der Muskelfaser, u.a. ausgelöst durch Inaktivität oder Denervation, wird die einzelne Zelle und somit das Muskelgewebe kleiner. Mit Hypoplasie bezeichnet man eine Reduktion der Zellanzahl (Lüllmann-Rauch und Asan 2019, S. 115–116).

Im Mausmodell, in welchem meistens der M. gastrocnemicus oder soleus untersucht wird, konnte mehrfach eine Muskelfasergrößenabnahme (Hypotrophie) bei Tumorkachexie gezeigt werden (Acharyya et al. 2005; Aulino et al. 2010). Dieses Modell ist jedoch nicht einfach auf den Menschen übertragbar, da sich der Tumor bei Mäusen nach Inokulation rasch entwickelt und bei Mäusen keine Komorbiditäten auftreten, die die Kachexie beeinflussen können. Zudem kann eine Tumordinokulation entlang mit Gewichtsverlust im Tiermodell schon an sich die Lokomotionsmuskeln verändern.

Eine konkrete Vorstellung der morphologischen Veränderung im Skelettmuskel des Menschen gibt es nur ansatzweise. Erst zwei klinisch ausgerichtete Arbeitsgruppen haben den von Kachexie betroffenen Skelettmuskel histologisch untersucht und keine einheitlichen Ergebnisse zeigen können: Weber et al. (2007) wiesen im Oberschenkelmuskel, Musculus vastus lateralis (M. vast. lat.), welcher eine dem M. rect. abd. ähnliche Muskelfasertypenverteilung zeigt, den Muskelschwund bei Kachexie als

eine signifikante Abnahme der Muskelfasergröße des Typ IIx nach. Auch der Fasertyp I zeigte eine tendenzielle Abnahme. Eine Abnahme der Muskelfasergröße des Typs IIa konnte nicht beobachtet werden. Verglichen wurden in der Studie Muskelbiopsien von Patienten mit Pankreas-, Magen-, Kolonkarzinom oder chronischer lymphatischer Leukämie mit über 10% Gewichtsverlust mit Proben aus selbiger Lokalisation von gesunden Freiwilligen. In derselben Probandengruppe erwies sich jedoch die Abnahme des Querschnitts aller Fasertypen im M. vast. lat. zusammen als signifikant (Weber et al. 2009).

Dagegen zeigte die Studie von (Johns et al. 2014) am M. rect. abd. keine Fasergrößenabnahme der kachektischen im Vergleich zu den gewichtsstabilen Tumorpatienten. Erst beim Vergleich von Tumorpatienten mit stabilem Gewicht mit denen über 2% Gewichtabnahme und zusätzlich CT-basierendem Nachweis von Muskelschwund, zeigte sich eine Muskelfasergrößenabnahme des Typs I und IIa. Der Muskelfasertyp IIx kam so selten vor, dass er nicht quantifiziert wurde.

Eine Reduktion des Myosins und / oder Aktins könnte die Muskelfaseratrophie erklären. In einer klinischen Studie mit Western-Blot wurde eine signifikante Reduktion beider MHC-Klassen des M. rect. abd. unter Tumorkachexie um 45% gemessen. Schmitt et al. (2007b) und Eley et al. (2007) zeigten eine signifikante Korrelation des Gewichtsverlusts mit der Myosinabnahme. Schmitt et al. (2007b) wiesen zudem eine signifikante, wenn auch im Vergleich zu Myosin geringere Abnahme von Aktin um 18% nach. Das Level von Moesin war jedoch gleichbleibend. Daraufhin vermuteten die Autoren, dass es sich nicht um einen unspezifischen Proteinverlust des kachektischen Muskels handelt, sondern vor allem das Myosin abgebaut wird. Dieser selektive Abbau der „Myosin Heavy Chains“ wird jedoch weiterhin kontrovers diskutiert (Casper und Leinwand 2012).

Wesentlich für die genaue Charakterisierung des Muskelschwunds bei Kachexie ist es, die Morphologie des Skelettmuskels, im Gegensatz zu den bisherigen o.g. Studien, an einem möglichst homogenen Patientenkollektiv mit kachektischen und nicht-kachektischen Patienten mit dukalen Pankreaskarzinom weitergehend zu untersuchen. Dies ist u.a. das Ziel der vorliegenden Arbeit.

1.6. Proteinmetabolismus / -umsatz bei Tumorkachexie

Unter Normalbedingungen setzen Erwachsene 3g Protein/kg Körpergewicht pro Tag um. 1/3 davon wird als Harnstoff mit dem Urin ausgeschieden und nicht wiederverwertet (Waterlow und Jackson 1981). Während einer Nahrungskarenz werden Muskelproteine abgebaut, um Aminosäuren für die Glukoneogenese in der Leber bereitzustellen. In längeren Hungerphasen wird der Proteinabbau reduziert, um Stickstoff zu sparen und die Hauptkörpermasse, besonders die Muskelmasse, zu erhalten. Stattdessen werden dann hauptsächlich aus Fettsäuren Ketonkörper gebildet, welche den Energiebedarf von Muskel und Gehirn decken (Argilés et al. 2007).

Aus noch nicht geklärten Gründen ist die Stoffwechselregulation zugunsten des myofibrillären Proteinerhaltes bei kachektischen Tumorpatienten, die meist auch unter Anorexie leiden, gestört. So kommt es bei Tumorpatienten auch bei ausreichender Kalorienzufuhr zu einer erhöhten Netto-Proteolyse (Melville et al. 1990). Bei Tumorkachexie kann bei einem Gewichtsverlust von 30% bereit ein 75- prozentiger Verlust der Proteinmasse vorliegen, wobei nicht-muskuläre Proteine relativ unberührt bleiben (Fearon 1992). Ob letztendlich eine Verminderung der Proteinsynthese oder eine gesteigerte Proteolyse oder beide Faktoren gemeinsam zur Tumorkachexie führen, ist umstritten.

Emery et al. (1984) und Lundholm et al. (1982) wiesen eine Reduktion der Proteinsynthese im humanen Muskel nach und konnten zugleich keine gesteigerte Proteolyse des Muskels zeigen. Die Proteinsynthese in der Leber vor allem, von Akute-Phase-Proteinen, nahm jedoch im Vergleich zu gesunden Probanden zu.

Eine gesteigerte Proteolyse zeigten Costelli et al. (1995) in ihrem Versuch mit Tumorratten. Tisdale (2010) hingegen beschrieb in einem Review eine Verminderung der Proteinsynthese gemeinsam mit einem vermehrten Muskelabbau als mögliche Ursache für die Netto-Proteolyse bei Tumorkachexie.

1.6.1. Proteinsynthese

1.6.1.1. PI3K-Signalweg

Der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) -Signalweg spielt eine große Rolle in der Regulation des Zellwachstums und -metabolismus. Unter physiologischen Bedingungen kann die PI3K auf mehreren Wegen aktiviert werden:

Über Rezeptortyrosinkinasen, wie z.B. den Insulin-Rezeptor oder den Epidermal-Growth-Factor- (EGF-) Rezeptor, können die entsprechenden Wachstumsfaktoren, Insulin und EGF, eine Phosphorylierung und somit eine Aktivierung der PI3K bewirken. Des Weiteren kann diese über das G-Protein Ras aktiviert werden (Vazquez und Sellers 2000).

Die aktivierte PI3K phosphoryliert wiederum Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP_2) zu Phosphatidylinositol-3, 4, 5-Triphosphat (PIP_3). PIP_3 kann AKT, das zentrale Enzym des PI3K-Signalwegs, binden und an die Zellmembran rekrutieren. Dort wird AKT durch die PIP_3 -abhängige Kinase 1 (PDK1) durch Phosphorylierung aktiviert. Das Phosphatase and Tensin Homolog (PTEN) ist der Gegenspieler der PI3K und somit der Akt-Aktivierung, da es PIP_3 dephosphoryliert (Rassow 2006, S. 568; Vazquez und Sellers 2000).

Eine Überexpression von Akt1 selbst oder des Insulin like growth factor 1 (Igf1), welcher über die Akt Serin/Threonin Kinase 1 (Akt1, Synonym: Akt, Pkb) wirkt, führt im Mausmodell und der Zellkultur zu einer dramatischen Hypertrophie der Muskeln (Rommel et al. 2001; Izumiya et al. 2008). AKT fördert die Aktivierung der Proteinsynthese durch Blockierung von MTOR (Mechanistic target of rapamycin). Des Weiteren vermittelt AKT antiapoptotische Effekte über die Phosphorylierung diverser Enzyme. So hemmt AKT die Forkhead Boxes (FOXO-Familie) und Caspase 3 (CASP3) und führt somit zu einer Verminderung der Proteolyse durch die E3-Ligasen des Ubiquitinsystems: F-box protein 32 (FBXO32, Synonym: ATROGIN1, MAFBX) und Tripartite motif containing 63 (TRIM63, Synonym: MURF1) (Fearon et al. 2012). Bei Tumorkachexie kann vermutet werden, dass die Regulation des Signalwegs verändert ist.

1.6.1.2. Myogenese

Die Regenerationsfähigkeit der Muskeln ist durch Satellitenzellen gewährleistet. Wenn ein Muskel verletzt ist, werden die Satellitenzellen aktiviert und exprimieren u.a. MyoD und die Expression von Paired box 7 (Pax7) wird gehemmt (Pessina et al. 2010). MyoD ist ein Transkriptionsfaktor der Muskelzellentwicklung, insbesondere von MHC IIb (Wheeler et al. 1999). Einige der Satellitenzellen können unter dem Einfluss von Myogenic differentiation 1 (Myod1) differenzieren, die anderen bleiben unter Einfluss von PAX7 als Stammzellen erhalten (Zammit et al. 2004).

1.6.2. Mögliche Mechanismen und Signalwege der kachexieassoziierten Proteolyse

Es gibt drei Wege der Proteolyse im Skelettmuskel: (I) Den ATP-abhängigen Ubiquitin-Proteasom Signalweg, über den Myofilamente abgebaut werden, (II) den Abbau von überwiegend extrazellulären Proteinen und Zellrezeptoren in Lysosomen und (III) das kalziumabhängige System des Calpains (Tisdale 2009). Zudem ist der programmierte Zelltod, die Apoptose, in allen Zellen des Körpers möglich.

Im Folgenden sollen diese Signalwege und deren Bedeutung für die Tumorkachexie dargestellt werden. Außerdem soll der Einfluss des Transkriptionsfaktors NFκB auf den Muskelstoffwechsel in diesem Kapitel näher beschrieben werden.

1.6.2.1. Ubiquitin-Proteasomen Signalweg

Das Ubiquitinsystem markiert fehlerhafte oder nicht mehr benötigte Proteine und führt sie dem proteasomalen Abbau zu. Als Markierung werden Polyubiquitinketten an das Protein geheftet. Hierfür wird Ubiquitin durch das E1-Enzym ATP-abhängig aktiviert, dann auf die E2-Konjugase übertragen und durch die E3-Ligase an das zu degradierende Protein gebunden. Entsprechend markiert wird das Protein ins Proteasom transportiert (Rassow 2006, S. 379–381). Jedes der drei Enzyme hat mehrere substratspezifische Vertreter: Fbxo32 und Trim63 sind zwei muskelspezifische E3-Ligasen, die den

Muskelproteinabbau im Proteasom einleiten und somit kritische Regulatoren und Indikatoren der Muskelatrophie sind (Bodine et al. 2001). Substrat des Trim63 ist vermutlich MHC. Trim63 konnte im Mausmodell den Abbau der Sarkomere induzieren (Clarke et al. 2007).

MYOD und EIF3, ein Translations-Initiationsfaktor, scheinen Substrate von FBXO32 zu sein und werden somit bei einer Hochregulierung von *FBXO32* vermehrt abgebaut (Lagirand-Cantaloube et al. 2008). Somit greift FBXO32 auch direkt in die Proteinsynthese hemmend ein.

Eine Schlüsselrolle für die Induktion der Transkription von *Trim63* und *Fbxo32* spielen u.a. Foxo1 und Foxo3 (Sandri et al. 2004). Die Foxo-Familie wird durch Akt1 (z.B. unter Insulin-Einwirkung) phosphoryliert und damit die Translokation in den Nukleus zur Transkriptionsinduktion dieser E3-Ligasen gehemmt (Abb. 2E) (Biggs et al. 1999). Ebenfalls wird Foxo3 durch PPARGC1a supprimiert.

Transgene Mäuse mit hochreguliertem Foxo3 zeigen einen dramatischen Verlust an Muskelmasse, sowohl durch Abnahme der Muskelfaseranzahl als auch deren Größe (Kamei et al. 2004).

Im Vergleich zwischen Tumorpatienten mit weniger als 5% Gewichtsverlust und Patienten, die einer Cholezystektomie unterzogen wurden, zeigte sich kein Unterschied in der Expression der beiden E3-Ligasen (Smith et al. 2011). Stephens et al. (2010) konnten bei Patienten mit durchschnittlich 9% Gewichtsverlust gegenüber gesunden Probanden ebenso keinen Unterschied beobachten. Die mRNAs der Ubiquitin-Proteasomen-Signalweg-Komponenten waren jedoch bei Tumorpatienten stärker exprimiert als bei Kontrollpatienten mit gutartigen Operationsindikationen (Williams et al. 1999). Auch im Rahmen der Sarkopenie und Immobilisation wird die Hochregulierung der E3-Ligasen kontrovers diskutiert (Johns et al. 2013). Nach einer 60-tägigen Immobilisation war histologisch eine deutliche Atrophie zu sehen und TRIM63 im Vergleich zur Kontrollgruppe, welche regelmäßig im Bett Übungen machte, hoch reguliert (Salanova et al. 2008). Edstrom et al. (2006) beobachteten in einer Studie zur Sarkopenie mit gealterten Ratten hingegen eine Herabregulierung von Trim63 und *Fbxo32*. Sie vermuteten, dass in diesem Fall andere Signalwege der Proteolyse eine Rolle

spielen und der Muskelschwund hauptsächlich der verringerten Muskelsynthese zugeschrieben werden kann.

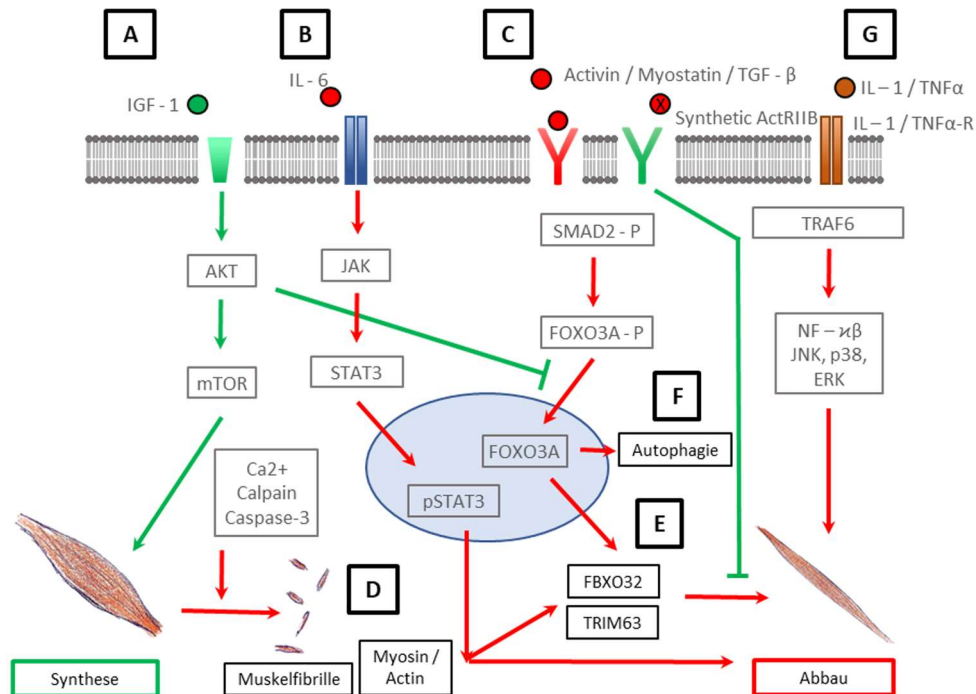


Abb. 2: Proteinumsatz bei Tumorkachexie im Muskel (Modifiziert nach Johns et al. 2013).

- A:** Regulation der Muskelproteinsynthese über IGF1 induzierte Hypertrophie.
- B:** JAK/STAT-Signalweg, involviert in der Akute-Phase Reaktion und in der Muskeldegeneration.
- C:** TGFβ induzierter SMAD-Signalweg, aktiviert durch Myostatin und Activin.
- D:** Kalzium induzierter Muskelabbau.
- E:** Muskelabbau durch den Ubiquitin-Proteasom-Signalweg mit den E3-Ligasen: FBXO32 und TRIM63.
- F:** Aktivierung und Transkription der Autophagie-Gene.
- G:** NFκB-Signalweg.

1.6.2.2. Autophagie / Lysosomen Signalweg

Ein weiterer denkbarer Abbauweg für Muskelproteine ist die Autophagie im Fusionsprodukt von Autophagosom und Lysosom (Porporato 2016; Tisdale 2009). Im Lysosom befinden sich diverse saure Hydrolasen, die Makromoleküle abbauen. U.a.

handelt es sich hierbei um Proteasen, Glykosidasen, Lipasen, DNAsen und RNAsen. Cathepsin L, B, D und H sind als Endoproteasen überwiegend für den Proteinabbau verantwortlich (Tisdale 2009). Aufgrund von Ergebnissen aus Mausmodellen mit durch Hunger induzierter Muskelatrophie wird vermutet, dass die Autophagie durch Foxo3-abhängige Transkription von Autophagie-Genen induziert wird. Diese sei unabhängig von der Aktivierung des Ubiquitinsystems (Abb. 2F) (Mammucari et al. 2007). In der klinischen Studie von Tardif et al. (2013) zeigte sich eindeutig ein erhöhtes Cathepsin-Level bei Tumorkachexie gegenüber gesunden Probanden.

1.6.2.3. Calpain

Ein dritter Abbauweg des Muskelproteins erfolgt über Calpain, ein kalziumabhängiges Enzymsystem (Abb. 2D). Es ist ein intrazelluläres, nicht-lysosomales Cystein-Proteasom, das in vielen regulatorischen Prozessen Ionenkanäle, Zelladhäsionsmoleküle und Zelloberflächenrezeptoren spaltet (Johns et al. 2013). Eine Beteiligung von Calpain konnte bei der Degradation von Ratten-Myofibrillen in der Zellkultur gezeigt werden. Durch Inhibition von Calpain kam es zu einer 20% geringeren Degradation (Purintrapiban et al. 2003). In der klinischen Studie von Smith et al. (2011) zeigte sich schon eine um 70% erhöhte Calpain Aktivität bei Patienten mit Magenkarzinom und unter 5% Gewichtsverlust gegenüber Probanden mit einer Cholelithiasis, was für eine eher frühe Rolle des Calpains in der Kachexie-Entwicklung sprechen könnte.

1.6.2.4. Apoptose und die Enzymkaskade der Caspasen

Auch der programmierte Zelltod, die Apoptose, könnte eine Rolle bei der Muskelatrophie spielen. Im Zentrum des apoptotischen Geschehens stehen die Caspasen, welche eine Enzymkaskade bilden. Initiatorcaspasen sind Caspase 2, 8, 9 und 10, die wiederum die Effektorcaspasen 3, 6 und 7 kontrollieren (Abb. 2D). Diese spalten Zellbestandteile und aktivieren DNAsen, die die DNA fragmentieren.

Die Apoptose wird von intrinsischen und extrinsischen Signalen beeinflusst. Extrinsische Signale werden über Ligandenbindung an die Tumornekrosefaktor- (TNF-)

Rezeptorfamilie, z.B. an den Fas-Rezeptor, an die Initiatorcaspasen im Zellinneren weiter geleitet. Der intrinsische Weg wird durch oxidativen Stress ausgelöst: B-cell lymphoma (Bcl-) Proteine machen die mitochondriale Membran permeabel, dadurch wird u.a. Cytochrom c freigesetzt, welches die Initiatorcaspasen aktiviert. Zu den Bcl-Proteinen gehören u.a. das apoptosefördernde *BCL2 associated X protein* (Bax) und das antiapoptotische Bcl. Durch oxidativen Stress wird das Gleichgewicht der Bcl-Proteine Richtung Apoptose verschoben (Koolman und Röhm 2009, S. 448).

Bossola et al. (2006) konnten in einer klinischen Studie weder erhöhte Caspase3-Aktivität noch eine erhöhte Anzahl TUNEL-positiver Zellkerne als Zeichen einer vermehrten Apoptose bei Patienten mit Magenkarzinom und Tumorkachexie von 6% im M. rect. abd. aufzeigen. Im Kontrast dazu steht die Studie von Busquets et al. (2007), die eine erhöhte Apoptoserate anhand einer 3-fach höhere DNA-Fragmentierung und einer 4-fach erhöht zersetzten Poly (ADP-ribose)-Polymerase im M. rect. abd. von Patienten mit Magen-Darm Tumoren und im Durchschnitt 5% Gewichtsverlust nachweisen konnten. In beiden Studien wurde die Kontrollgruppe mit Patienten, die aufgrund einer benignen Tumors operiert wurden, gebildet. Die entgegengesetzten Ergebnisse der beiden Studien könnten durch den unterschiedlichen Durchschnitt des Gewichtsverlusts oder der Tumorlokalisation bedingt sein.

1.6.2.5. NFκB-Signalweg

Nuclear factor kappa B (NFκB) ist ein redoxsensitiver Transkriptionsfaktor, der über Bindung an bestimmte regulatorische Abschnitte der DNA die Transkription von z.B. Zytokinen, Cyclooxygenasen, Wachstumsfaktoren und Inhibitoren der Apoptose reguliert. NFκB liegt meistens gebunden an IκB und somit inaktiviert im Zytoplasma vor. Ausgelöst durch proinflammatorische Zytokine (TNF, Interleukin 1 (IL1)) wird IκB phosphoryliert und im Proteasom abgebaut, wodurch die Translokation von NFκB in den Nukleus und die Induktion der Expression der Zielgene ermöglicht wird (Abb. 2G) (Gilmore 2006; Mondello et al. 2014). NFκB fördert nach Aktivierung durch TNF die Proteolyse über das Ubiquitinsystem und hemmt die Myogenese (Langhans 2002), indem es die mRNA von MyoD hemmt (Guttridge et al. 2000).

1.7. Mediatoren der Tumorkachexie

Die Kachexie ist multifaktoriell bedingt. Verschiedene meist zirkulierende Zytokine (Interleukine, Interferone, TNF), Wachstumsfaktoren und weitere Mediatoren scheinen die Progression des Gewichtsverlustes systemisch zu beeinflussen.

1.7.1. Systemische proinflammatorische Mediatoren

Die lokale sowie systemische Entzündung ist ein Markenzeichen des Tumors und scheint eine große Rolle in der Entstehung der Tumorkachexie zu spielen (Argilés et al. 2012). Jedoch weiß man noch nicht, ob die proinflammatorischen Zytokine von Tumorzellen oder von eigenen Entzündungszellen sezerniert werden oder der Ursprung bei beiden liegt (Mondello et al. 2014).

1.7.1.1. JAK/STAT-Signalweg

Viele Zytokine, u.a. Interleukine und Interferone, wirken über den JAK/STAT-Signalweg (Abb. 2B). Auf der zytosolischen Seite des Rezeptors ist die Januskinase (JAK), eine Tyrosinkinase, gebunden. Bindet ein Ligand an den Rezeptor, kommt es zur Dimerisierung zweier Rezeptoren, welche zur Autophosphorylierung der JAK-Kinasen im Zellinneren führt. Dies hat eine weitere Phosphorylierung der Rezeptoren zu Folge, woraufhin eine Bindung und Phosphorylierung der Signal Transducers and Activators of Transcription- (STAT-) Proteinen ermöglicht wird. Diese dimerisieren und wirken als Transkriptionsfaktor für STAT-abhängige Gene der Entzündung, Proliferation und Angiogenese, sowie SOCS, ein Gen für die negative Feedback-Regulation (Rassow 2006; Carson und Baltgalvis 2010).

1.7.1.2. Interleukin 6

Interleukin 6 (IL6) ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches eine Schlüsselrolle in der Tumorkachexie-Entstehung spielen soll (Martignoni et al. 2005). Die Sekretion von

IL6 erfolgt hauptsächlich durch aktivierte Makrophagen. Aber auch viele andere Zelltypen wie Muskelzellen, Tumorzellen, Fibroblasten, Adipozyten und Gefäßendothelzellen sezernieren IL6. Stimuliert wird die Sekretion durch Interleukin 1, welches pro- und antiinflammatorische Komponenten hat (Munoz-Canoves et al. 2013; Tisdale 2009; Martignoni et al. 2005; Mohamed-Ali et al. 1997; Akira et al. 1993).

In mehreren Studien konnte ein signifikanter Anstieg der Serumkonzentration von IL6 bei kachektischen Patienten gemessen werden (Iwase et al. 2004; Martignoni et al. 2005). Die Konzentration des im Blut zirkulierenden IL6 korrelierte positiv mit dem Gewichtsverlust, als auch mit einem reduzierten Überleben von Tumorpatienten (Scott et al. 1996). Diese Ergebnisse widersprechen allerdings den Beobachtungen von Maltoni et al. (1997), die keine signifikante Korrelation zwischen dem Gewichtsverlust der Patienten mit Pankreastumor und IL6 bzw. weiteren Zytokinen (IL1, TNF oder Interferon- γ) fanden. Ob der Skelettmuskel für die bei Tumorkachexie erhöhte Serumkonzentration von IL6 die Sekretionsquelle ist, ist noch nicht geklärt. Es ist bekannt, dass IL6 bei Beanspruchung des Skelettmuskels durch körperlicher Belastung von diesem vermehrt ausgeschüttet wird (Ostrowski et al. 1998) und IL6 wird daher von Munoz-Canoves et al. (2013) als Myokin charakterisieren. IL6 wirkt wie bereits in Kap. 1.7.1.1 beschrieben über den Membranrezeptor der JAK-/STAT-Kinase (Abb. 2B) als Mediator der Tumorkachexie. Ein kurzfristiger IL6 Anstieg fördert Muskelregeneration und -wachstum. Eine dauerhafte Erhöhung der IL6-Konzentration führt zu einer Muskelzellatrophie (Munoz-Canoves et al. 2013). Der Grund für diese entgegengesetzte Wirkung ist Gegenstand aktueller Forschung. In einer klinischen Studie mit gesunden Probanden, denen IL6 infundiert wurde, konnte gezeigt werden, dass ein erhöhtes IL-6 Level den Proteinumsatz um 50% erhöht (van Hall et al. 2008). Die Proteinsynthese war hierbei mehr supprimiert als der Proteinabbau. Zudem wird durch IL6 die Produktion von Akute-Phase Proteinen in Hepatozyten stimuliert (Castell et al. 1989). Patienten, die in einer Phase-II-Studie mit einem IL6 Sekretionshemmer (Selumetinib) behandelt wurden, wiesen eine signifikante Muskelmassenzunahme auf (Prado et al. 2012). Auch bei einem einzelnen Patient, der mit einem monoklonalen Antikörper gegen den IL6 Rezeptor (Tocilizumab) therapiert wurde, besserte sich die Tumorkachexie laut Fallbericht deutlich (Ando et al. 2013).

1.7.1.3. Tumornekrosefaktor

Der Tumornekrosefaktor (TNF), initial entdeckt unter dem Namen „Cachectin“, wird von aktivierten Makrophagen produziert (Beutler und Cerami 1986). Wie bereits beschrieben, aktiviert TNF den NF κ B-Signalweg (Abb. 2G) (Johns et al. 2013).

In vitro wurde gezeigt, dass Tnf die Differenzierung der Maus-Myozyten hemmt (Guttridge et al. 2000) und die Proteolyse über das Ubiquitinsystem durch Induktion der E3-Ligasen fördert (Sishi und Engelbrecht 2011). Im Mausmodell wurde entdeckt, dass Tnf oxidativen Stress und die Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) induziert (Schulze-Osthoff et al. 1993; Buck und Chojkier 1996), den zuvor beschriebenen Insulinabhängigen PI3K-Signalweg (Kap. 1.6.1.1) hemmt und somit die Insulinresistenz steigert (Hotamisligil 1999). Daraufhin wurden einige klinische Studien mit TNF-Inhibitoren durchgeführt. Jedoch konnte oft kein positiver Einfluss der TNF-Antikörper-Therapie auf die Tumorkachexie gezeigt werden. So nahm bei Patienten, die von Jatoi et al. (2010) behandelt wurden, die Fatigue zu und die Lebensqualität verschlechterte sich ohne Gewichtszunahme, sodass die Studie vorzeitig abgebrochen wurde. Thalidomid, ein Hemmer der TNF-Synthese, hingegen scheint einen Gewichtsverlust bei Patienten mit Pankreaskarzinom abschwächen zu können und wurde gut vertragen (Gordon et al. 2005).

1.7.1.4. Akute-Phase-Proteine

Die chronische Entzündung mit einer verlängerten Akute-Phase-Reaktion spielt eine Schlüsselrolle bei der Tumorkachexie (Martignoni 1994). Die Akute-Phase-Proteine (APP) wie C-reaktives Protein, α -1-Antitrypsin und Fibrinogen sind Proteine des Komplementsystems und Teil des angeborenen, unspezifischen Immunsystems. Sie werden kurz nach dem Beginn einer Entzündung von den Hepatozyten gebildet und sezerniert. Stimuliert wird die Bildung der APP durch mit der Kachexie-assoziierten, o.g. Zytokinen wie IL1, IL6 und TNF (Rassow 2006). Im Gegenzug wird weniger des Anti-Akute-Phase-Proteins Albumin gebildet. Somit kommt es zu einer begleitenden Hypoalbuminämie bei Tumorkachexie (Fearon et al. 1998), welche durch eine erhöhte

Gefäßpermeabilität verstärkt wird (Fearon et al. 2012). Hypoalbuminämie ist, wie eingangs beschrieben, ein Parameter der Kachexiediagnostik. Niedrige Spiegel im Plasma weisen auf eine schlechtere Prognose bei malignen Tumoren hin (Sirott et al. 1993).

Das C-reaktive Protein (CRP) ist im Blut ein sensitiver, aber unspezifischer Marker für Entzündung. Bei vielen Tumorerkrankungen kann die Bestimmung von CRP zur Unterstützung der Prognosevorhersage verwendet werden (Walsh et al. 2003). Zudem korreliert CRP u.a. mit der Konzentration von IL6 im Blut (Walsh et al. 2003) und erhöhte Werte konnten bei Kachexiepatienten im Vergleich zu gesunden Testperson nachgewiesen werden (Fearon et al. 1998).

Um den hohen Bedarf an essentiellen Aminosäuren für die hepatische Synthese von APP zu decken, werden kompensatorisch Muskelproteine bereitgestellt. Diese stammen vermutlich aus der erhöhten Nettoproteolyse, ohne dass klinisch ein erhöhter Efflux von Aminosäuren nachgewiesen werden konnte (Holm et al. 2007). Verstärkt wird diese negative Proteinbalance bei Tumorkachexie durch die zumeist bestehende verminderte Proteinaufnahme bei geringem Appetit (Kotler 2000) und die beschriebene veränderte Proteinsynthese (Tisdale 2010).

1.7.2. Katabole Regulatoren der Muskelmasse

1.7.2.1. Myostatin und Aktivin (TGF- β Familie)

Membranrezeptoren mit Serin-/Threoninkinaseaktivität vermitteln die Wirkung des Zytokin Transforming Growth Factor Beta (TGFB) (Abb. 2C). Myostatin (MSTN, Synonym: GDF8) und Aktivin sind zwei Hormone, die zur TGFB-Familie gehören. Es wird vermutet, dass sie eine wichtige Rolle bei der Kachexie-Entwicklung spielen (Elliott et al. 2012).

Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass Mstn an einen Serin-/ Threoninkinase-Rezeptor, den Aktivin Rezeptor Typ 2B (ActRIIB), bindet. Die Rezeptoren oligomerisieren und werden durch Phosphorylierung aktiv. Dadurch kann das Rezeptor-regulierte

SMAD-Protein phosphoryliert werden, welches ein Heterodimer mit SMAD4 bildet. Im Zellkern stimuliert dieses Dimer die Transkription der E3-Ligasen des Ubiquitinsystems *Fbxo32* und *Trim63* und führt somit zur Proteolyse (Rebbapragada et al. 2003; Rassow 2006).

Im Mausmodell mit inokulierten Adenokarzinomzellen zeigte sich bei einer Blockade dieses Signalwegs durch einen rekombinanten sActRIIB, dass die E3-Ligasen nicht aktiviert werden und dies zu einer Netto-Muskelzunahme, sowie einem verlängerten Überleben führt (Zhou et al. 2010). Mstn-defiziente Mäuse wiesen eine signifikante Muskelmassenzunahme auf (McPherron et al. 1997). Außerdem scheint ein Funktionsverlust von Mstn im Mausmodell, sowie in der Zellkultur die Insulinsensitivität zu verbessern. Mstn reguliert den Glukosehaushalt über die Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase (AMPK) (Chen et al. 2010). Darüber hinaus beschrieb selbige Arbeitsgruppe, dass in den Mstn-behandelten Muskelzellkulturen auch vermehrt IL6 sezerniert werde. Dass eine Modellübertragung auf den Menschen möglich ist, konnte in einer klinischen Studie mit immobilisierten Patienten gezeigt werden, bei denen sich eine negative Korrelation zwischen MSTN und Muskelmasse nachweisen ließ (Zachwieja et al. 1999). In einer weiteren klinischen Studie konnte auch eine erhöhte im Blut zirkulierende Aktivin Konzentration bei kachektischen gegenüber nicht kachektischen Patienten gemessen werden. Diese korrelierte positiv mit dem Gewichtsverlust (Loumaye et al. 2015). Bei einem Kleinkind konnte stark vermehrtes Muskelwachstum auf eine Loss-of-function-Mutation des *MSTN*-Gens ohne andere Krankheitsanzeichen zurückgeführt werden (Schuelke et al. 2004). Daher wird erwartet, dass eine Antikörpertherapie gegen Myostatin oder dessen Rezeptor der Kachexie entgegen wirken kann. Einige vielversprechende Phase-II Studien werden aktuell durchgeführt (Elliott et al. 2012; Smith und Lin 2013).

1.7.3. Andere zirkulierende Mediatoren

1.7.3.1. Vitamin D

Vitamin-D-Mangel könnte ein Mitverursacher der Tumorkachexie sein. Es konnte gezeigt werden, dass viele, teilweise sogar über 85% der Tumorpatienten einen Vitamin-D-Mangel haben (Brown et al. 2007; Stone et al. 2011). Tumorpatienten mit bestimmten Vitamin D Rezeptor Polymorphismen haben eine eher aggressive Kachexie (Punzi et al. 2012). Aktuell liegen jedoch keine Studien zur Auswirkung einer Vitamin D Gabe auf die Tumorkachexie vor. Eine kleine Studie von van Veldhuizen et al. (2000) mit 16 Probanden deutet darauf hin, dass eine Vitamin-D-Gabe die Muskelkraft von Patienten mit Prostatakarzinom verbessert.

Darüber hinaus wurde beobachtet, dass ein Vitamin-D-Defizit bei älteren Menschen zu einem erhöhten Sturzrisiko führt. Die Gabe von Vitamin D fördert sowohl die Zunahme der Anzahl als auch des Faserdurchmessers des schnell kontrahierenden Muskelfasertyps II (Sato et al. 2005) und mindert somit das Sturzrisiko bei älteren Patienten (Ceglia 2009).

1.7.3.2. Glukokortikoide

Glukokortikoide könnten bei der Behandlung einer Kachexie adjuvant verwendet werden, da sie den Appetit und somit die Nahrungsaufnahme fördern und das Befinden der Patienten verbessern. Jedoch führen Glukokortikoide auch zu einer Atrophie des Muskels, v.a. des Muskelfasertyp II (Tisdale 2009). Es wird vermutet, dass dieser Muskelabbau über das Ubiquitin-Proteasom-System stattfindet (Hasselgren 1999), indem es die Aktivität des PI3K-Signalwegs herabsetzt (Tisdale 2009).

1.8. Glukosestoffwechsel und Insulinresistenz bei Tumorkachexie

Insulin wirkt einerseits über den Insulinrezeptor und den anschließende PI3K-Akt-Signalweg über MTOR auf die Proteinsynthese, andererseits durch eine Hemmung der CASP3-Aktivität, der FOXO-Familie und somit des Ubiquitinsystems, hemmend auf die Proteolyse (Abb. 2A) (Mondello et al. 2014).

Bei Tumorkachexie scheint es zu einer Veränderung des Kohlenhydratstoffwechsels zu kommen. So zeigten sich in mehreren Studien bei kachektischen Patienten eine Insulinresistenz (Tayek 1992; Noguchi et al. 1998; Winter et al. 2012) und ein zeitlich verzögerter Abfall der Glukosekonzentration im Blut gegenüber gesunden Probanden (Holroyde et al. 1984) unter definierter intravenöser Glukosebelastung mittels der Clamp-Technik. Die mRNA Expression des Glukose-Transporter 4 (GLUT4), der die Glukoseaufnahme in der Peripherie insulinabhängig ermöglicht, war im Skelettmuskel bei Patienten mit gastrointestinalen Tumoren gegenüber gesunden Probanden deutlich herabgesetzt (Noguchi et al. 1998). Weiterhin gelten proinflammatorische Zytokine, wie TNF, als auslösende Faktoren der Insulinresistenz, indem sie z.B. die Phosphorylierung der Insulinrezeptoren verhindern und somit den PI3K-Signalweg hemmen (Feinstein et al. 1993).

Hinzu kommt, dass selbst kleine Tumore einen hohen Glukoseverbrauch haben (Tayek 1992). Im Rattenmodell sind bei Vorhandensein eines Tumors die in der Leber an der Glukoneogenese beteiligten Enzyme vermehrt aktiviert (Noguchi et al. 1989). Ähnlich dem metabolischen Zustand des peripheren Gewebes bei der Sepsis, wird im Tumor die Glukose nur bis zum Laktat abgebaut und in der Leber über den Corizyklus, der viel ATP verbraucht, ineffizient recycelt (Waterlow und Jackson 1981; Argilés et al. 2007). Durch diesen erhöhten Glukosefluss und -verbrauch kommt es zu einem erhöhten Energiebedarf mit einem erhöhten Grundumsatz (Eden et al. 1984), der eine weitere Ursache für die Kachexie sein könnte.

1.9. Monoaminoxidase A und B

MAOA und *MAOB* sind Gene für mitochondriale Enzyme, die die biogenen Monoamine wie Serotonin, Dopamin und Noradrenalin unter Verbrauch von Wasser und Sauerstoff zu Aldehyd, Ammoniak und Wasserstoffperoxid abbauen. Beide Enzyme liegen gebunden an der äußeren Mitochondrienmembran vor.

MAOA ist v.a. für die oxidative Desaminierung der Katecholamine Noradrenalin und Serotonin zuständig, *MAOB* baut u.a. Phenylethylamin und Benzylamin ab (Houslay und Tipton 1974; Nair et al. 1993; Rassow 2006, S. 780). Sie unterscheiden sich somit durch ihre unterschiedliche Affinität zu Substraten, Sensitivität zu Inhibitoren und zudem in der Gewebeverteilung. Die Konzentration von mittels Northern Plot gemessener cDNA von *MAOA* im Gewebe ist folgende: Dünndarm > Placenta > Lunge > Muskel > Niere > Gehirn > Rückenmark > Leber > Milz > Nebenniere. Die Konzentration von *MAOB* im Gewebe: Dünndarm > Niere > Leber > Nebenniere > Herz > Rückenmark > Lunge. Nur sehr wenig *MAOB* ist im Muskel und fetalen Gehirn zu finden. Je älter das Gehirn wird, desto höher ist dort die *MAOB* Aktivität (Grimsby et al. 1990).

Es konnte gezeigt werden, dass Verwandte ersten Grades von Diabetes Typ-2 Patienten ein um 70% reduziertes *MAOA* Expressionslevel im M. vast. lat. haben (Elgzyri et al. 2012). Die Plasmakonzentration von Katecholaminen ist bei Diabetikern aufgrund einer geringeren Abbaurate höher, als bei Gesunden (Christensen 1970). Weiterhin erhöht Adrenalin durch Hemmung der Insulinsekretion und der peripheren Glukoseaufnahme die Plasmaglukosekonzentration (Schmidt und Lang 2007, S. 477). Elgzyri et al. (2012) schlussfolgerten, dass ein niedriges *MAOA*-Level mit einer reduzierten Insulinsekretion und Glukoseaufnahme assoziiert ist.

Andererseits zeigen Zellkulturstudien an humanen Myozyten, welche mit Dexamethason behandelt wurden, dass hierdurch *MAOA* stark exprimiert wird und somit vermehrt Wasserstoffperoxid produziert wird, welches oxidativen Stress verursacht (Manoli et al. 2005)

Ob bei Tumorkachexie, die einerseits mit Insulinresistenz, andererseits mit oxidativem Stress assoziiert sein kann, auch eine erhöhte oder erniedrigte Expression der

Monoaminoxidasen zu messen ist, soll in der vorliegenden Studie herausgefunden werden.

1.10. Fettstoffwechsel und Lipolyse bei Tumorkachexie

Bei Tumorkachexie ist gegenüber Gesunden der Fettumsatz erhöht und es kommt durch vermehrte Lipolyse zu einer Abnahme des Fettgewebes (Shaw und Wolfe 1987). Thompson et al. (1993) konnten eine erhöhte Konzentration an Triglyceriden und freien Fettsäuren im Serum von Tumorpatienten gegenüber Patienten mit benigner Indikation zur Operation messen. Außerdem war die mRNA der Hormon-sensitiven Lipase im Fettgewebe bei Tumorpatienten vermehrt exprimiert. Dagegen war die Aktivität dieser Lipase im Fettgewebe, die in diversen Geweben extrazellulär auf dem Endothel lokalisiert ist und Fett von Lipoproteinen abspaltet, nicht erhöht. Die freigesetzten Triglyceride werden durch Hydrolyse in Glycerin und Fettsäuren gespalten, wobei die Glycerine in der Leber für die Glukoneogenese weiter verstoffwechselt werden (Tisdale 2009). Aus den Fettsäuren wird über die β -Oxidation, mit dem Endprodukt Acetyl-CoA, und anschließender Ketogenese Energie in Form von Ketonkörpern gewonnen (Tisdale 1997).

1.11. Aminosäuremetabolismus bei Tumorkachexie

Im physiologischen Zustand werden verzweigtkettige Aminosäuren, insbesondere Leucin, im Austausch mit Glutamin, über System L Transporter (L solute carriers, LAT1) in den Skelettmuskel aufgenommen. Glutamin gehört zu den neutralen Aminosäuren, welche zuvor über einen Natrium-abhängigen System A Transporter (Sodium coupled neutral amino acid transporter, SNAT2) in den Skelettmuskel gelangen (Dodd und Tee 2012).

Der Skelettmuskel ist ein wichtiger Speicherort der Aminosäuren. Nur wenige Aminosäuren liegen außerhalb von Proteinen in gelöster Form oder gebunden an Albumin im Extrazellularraum vor. Bei erhöhtem Abbau der Skelettmuskulatur werden im Rahmen der Proteolyse auch verstärkt Aminosäuren freigesetzt (Brosnan 2003).

1.11.1.1. Glutamin, Alanin und Stickstoffbilanz

Glutamin und Alanin bilden anteilmäßig den größten Pool der durch Proteolyse des Muskels freigesetzten Aminosäuren. Alanin wird über das Splanchnikusgebiet für die von der Leber vermehrt gebildeten Akute-Phase-Proteine und die Glukoneogenese aufgenommen (Argilés et al. 2007; Hasselgren 1999). Ebenso wird Ammoniak, welches durch Proteolyse des Muskels als auch während der Zellnekrose eines Tumors freigesetzt wird, hauptsächlich in der Leber weiter verstoffwechselt (Holm et al. 1995). Glutamin ist die freie Aminosäure mit der höchsten Konzentration im Plasma. Ihre wichtigste Funktion ist der Stickstofftransport zwischen der Peripherie (v.a. Skelettmuskel), der Leber und der Niere (Argilés et al. 2001). Holm et al. (2007) maß bei Tumorpatienten gegenüber gesunden Probanden im Bein einen verringerten Efflux von Glutamin und eine verminderte Aufnahme von Glutamat. Glutamin und ein großer Teil der in der Leber gebildeten Glukose wird vom Tumorgewebe für den erhöhten Nitrogen- und Energiebedarf verwendet (Argilés et al. 2007).

1.11.1.2. Verzweigtkettige Aminosäuren und Glycin

Es gibt viele Hinweise darauf, dass die verzweigtkettigen Aminosäuren, v.a. Leucin, die Muskelproteinsynthese über mehrere Mechanismen fördern. Intrazelluläres Leucin stimuliert den Muskelproteinaufbau durch Aktivierung und Phosphorylierung von MTOR, den Initiierungsfaktoren der Translation und der Ribosomale protein S6 kinase B1 (RPS6KB1) (Gingras et al. 2001; Kimball und Jefferson 2001; Casperson et al. 2012). Schmitt et al. (2007b) wiesen eine signifikant geringere Phosphorylierung von MTOR und RPS6KB1 bei kachektischen Patienten mit Pankreaskarzinom gegenüber nicht kachektischen Patienten mit Pankreastumor oder chronischer Pankreatitis nach. Ob bei diesen Patienten entsprechend das anabol wirkende intrazelluläre Level von Leucin im Skelettmuskel herabgesetzt war, wurde nicht erfasst, wird aber in der vorliegenden Studie untersucht.

Des Weiteren wird vermutet, dass Leucin die Insulin-Sekretion fördert (Sugden und Fuller 1991) und somit zusätzlich indirekt proteinanabol wirkt. Insulin fördert und

reguliert über eine Interaktion mit der Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat-3 Kinase MTOR (s. Kap. 1.6.1.1).

Wie bereits beschrieben, besteht jedoch bei Tumorkachexie meist eine Insulinresistenz (Kap. 1.8, S. 22). Diese wurde bei Mäusen mit Kolonkarzinom schon vor Auftreten einer Kachexie und somit als früher Marker hierfür, beschrieben (Asp et al. 2010). Die Insulinresistenz erklärt auch die fehlende Hemmung der Glukoneogenese in der Leber und den verminderten Glukosestoffwechsel im Muskel (Argilés et al. 1997). Insulinresistenz bei Kachexie, welche den Muskelaufbau verhindert, konnte bei Tumorpatienten mit nichtkleinzelligen Lungenkarzinom durch Hyperaminoacidämie mittels Infusion von v.a. verzweigtkettigen Aminosäuren aufgehoben werden (Winter et al. 2012). Gannon und Vaughan (2016) vermuteten, dass Leucin zusätzlich die Insulin-Sensitivität durch ein verändertes GLUT4-Level verbessert.

Nicht zuletzt fördert Leucin in vitro den oxidativen Metabolismus und die Expression der Atmungskettenkomponente Cytochrom c, welches für die Energiegewinnung im Muskel eine wichtige Rolle spielt (Vaughan et al. 2013).

Die Lysosom-abhängige Proteolyse wiederum wird durch einen Leucinmangel signifikant begünstigt (Mordier et al. 2000).

Verstärkt wird dieser Prozess dadurch, dass ein entzündeter Skelettmuskel wahrscheinlich aufgrund von Entzündungsmediatoren und erhöhtem oxidativen Stress gegenüber anabolen Signalen durch Leucin resistent wird (Ham et al. 2016). Ein Tumor führt u.a. zu einer inflammatorischen Antwort, indem der Tumor selbst, sowie aktivierte Immunzellen Zytokine, Chemokine und andere Entzündungsmediatoren freisetzen, welche eine treibende Kraft hinter den oben beschriebenen metabolischen Veränderungen und somit der Kachexie bei Karzinompatienten sind (Argilés et al. 2014).

Diese entzündungsassoziierten Faktoren gemeinsam mit einem häufig zu beobachtenden verminderten Appetit, hemmen wiederum die Nahrungsaufnahme und damit auch die externe Aminosäurezufuhr (Durham et al. 2009; Morley et al. 2006).

1.11.1.3. Glycin

Glycin kann die Leucin-Resistenz des Skelettmuskels im Zustand der systemischen Entzündung aufheben, die anabole Wirkung von Leucin wiederherstellen und somit die Proteinsynthese fördern und den oxidativen Stress, welcher mit dem Muskelschwund assoziiert ist, reduzieren (Ham et al. 2016). Es wurde auch gezeigt, dass Glycin einen hemmenden Effekt auf die Entzündungszellen selbst und eine zellschützende und eine immunmodulierende Wirkung hat (Zhong et al. 2003). Außerdem ist Glycin zusammen mit Cystein und Glutamat eine Vorläuferaminosäure des Antioxidans Glutathion. Schmitt et al. (2007a) beschrieben im kachektischen Skelettmuskel von Tumorpatienten eine Verringerung des Gesamt- und des reduzierte Glutathions, sowie eine signifikant verminderte Carnosinkonzentration. Das Dipeptid Carnosin ist ein weiteres Antioxidans, bestehend aus Histidin und β -Alanin.

1.12. Pharmakologische Behandlungsmöglichkeiten der Tumorkachexie

Wie bereits beschrieben, ist die Kachexie nicht allein durch verbesserte Ernährung oder Nahrungsergänzungsmittel zu therapieren. Notwendig ist vielmehr eine multimodale Kombinationstherapie aus exakt zugeschnittenen Nährstoffen, Sport und Medikamenten, welche eine Muskelhypertrophie induzieren oder den Muskelabbau blockieren (Mondello et al. 2014). Nur auf diese Weise kann die Lebensqualität und Prognose von Tumorpatienten mit hoher Prävalenz der Kachexie verbessert werden.

Studien zur Optimierung der Ernährung beinhalten die Supplementierung mit Leucin (Casperson et al. 2012), Antioxidantien (Derbre et al. 2014) bzw. eine Sicherstellung der ausreichenden Nahrungszufuhr über eine parenterale Ernährung (Evans et al. 1985) oder Magensonde (Cady 2007; Kusakabe et al. 2011) z.B. bei Appetitmangel oder Passagehindernissen durch einen großen Tumor oder eine Schwellung.

Darüber hinaus wurden in einigen klinischen Studien bereits u.a. Anabolika (Gold et al. 1996), Entzündungshemmer (Gold et al. 1996), Antikörpertherapie gegen Myostatin (Elliott et al. 2012) und Zytokininhibitoren (Gordon et al. 2005; Ando et al. 2013) in der Kachexietherapie eingesetzt, die im Ergebnis zumindest teilweise zu einer Gewichtszunahme führten.

Die Tumorkachexie wird zumeist erst spät diagnostiziert und eine daraufhin eingeleitete Therapie hat entsprechend geringere Erfolgschancen. Nicht zuletzt deshalb muss zunächst ein molekulares Verständnis der Mechanismen der Tumorkachexie entwickelt werden und klinisch verlässliche Biomarker gefunden werden, mit denen frühzeitig die Tumorkachexie diagnostiziert werden kann.

Aufgrund der eingeschränkten Übertragbarkeit von Ergebnissen aus Tierversuchen zur Kachexie auf den Menschen (Johns et al. 2013) und der bisher begrenzten Anzahl klinischer Studien zu Ursachen und Therapien der Tumorkachexie, dürfte noch umfangreiche Forschung mit u.a. großen randomisiert kontrollierten klinischen Studien nötig sein, bis die Tumorkachexie erfolgreich behandelt werden kann.

1.13. Fragestellung und Ziel der Arbeit

In dieser klinischen Studie sollen anhand von Muskelbiopsien im Querschnittsdesign (Vergleich von Patienten mit Pankreastumor mit und ohne Kachexie) mit Tumorkachexie assoziierte Veränderungen des Skelettmuskels auf morphologischer-, Protein-, Aminosäure- und Genexpressions- Ebene untersucht werden, um mögliche Faktoren und Prädiktoren der Kachexie für weitere Studien zu identifizieren.

Es wurden intraoperativ entnommene Muskelproben des M. rect. abd. von Patienten mit Pankreaskarzinom verwendet, da diese Patienten die höchste Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung einer Tumorkachexie haben (Dewys et al. 1980). Die in der Studie eingeschlossenen Patienten waren erstmalig zur geplanten kurativen Operation stationär aufgenommen. Zu diesem Zeitpunkt sind meist noch keine neoadjuvante Chemotherapien durchgeführt, die die Ergebnisse beeinflussen könnten.

Ziel dieser Studie ist es durch ein tieferes Verständnis der Tumorkachexie assoziierten Veränderungen im Skelettmuskel eine Grundlage für die Entwicklung objektiver Biomarker für die Diagnostik, sowie neue Ansatzpunkte für eine Therapie der Tumorkachexie aufzuzeigen.

Im Einzelnen werden folgende Fragen in Bezug auf Tumorkachexie konkretisiert:

Morphologie des Skelettmuskels:

- Kommt es zu einer Atrophie oder einer Hypoplasie der Muskelzellen?
- Verändert sich die Muskelfaserkomposition?
- Ist die Anzahl der Kapillarkontakte verändert?
- Liegt ein Zellschaden vor oder sind Anzeichen für eine Muskelzellregeneration sichtbar?

Gen- und Proteinexpression:

- Sind Atrophie-relevante Gene höher exprimiert (TRIM63; FBXO32, MMP9, PAX7)?
- Sind Apoptose-relevante Gene (BAX, CASP3, BCL-2) erhöht exprimiert?

- Welche proinflammatorischen Gene (CD68, IL1B, IL6, IL8, GDF15, PTGS2, SOCS3, TNF) werden vermehrt oder vermindert exprimiert?
- Liegt erhöhter oxidativer Stress durch vermehrte Expression der Monoaminoxidasen (MAOA, MAOB) vor? Kann dieser durch Glutathion reduziert werden (GCS, GSR)?
- Gibt es Hinweise auf eine veränderte Angiogenese (VEGFA, VEGFB, KDR)?

Aminosäuren:

- Verändert sich die intrazelluläre Aminosäurekonzentration (im Besonderen von den anabol wirksamen Aminosäuren Leucin und Isoleucin oder den Vorläufern der Antioxidantien Glutathion und Carnosin)?

2. MATERIALIEN UND METHODEN

2.1. Materialien

2.1.1. Antikörper

Name	Katalognummer	Bezugsquelle
Primärantikörper monoklonal Maus anti-human CD31	MO 832	Dako, Hamburg
Sekundärantikörper Kaninchen anti Maus IgG	315-065-045	Dianova, Hamburg

2.1.2. Primer

Name	Symbol	Amplikonlänge (bp)	Katalognummer
Actin beta	ACTB	146	QT00095431
BCL2-associated X protein	BAX	111	QT00031192
B-cell lymphoma 2	BCL2	80	QT00025011
Caspase 3	CASP3	147	QT00023947
Cluster of differentiation 68	CD68	73	QT00037184
F-box protein 32	FBXO32	106	QT00066829
Gamma-glutamylcysteine synthetase	GCS	118	QT00037310
Growth differentiation factor 15	GDF15	114	QT00082558
Glutathione-disulfide reductase	GSR	143	QT00038325
Interleukin 1 β	IL1 β	117	QT00021385
Interleukin 6	IL6	107	QT00083720
Interleukin 8	IL8	102	QT00000322
Kinase Insert Domain Receptor	KDR	78	QT00069818
L-Typ Amino Acid Transporter 1	LAT1	106	QT00089145
Monoaminoxidase A	MAOA	111	QT00040411

Name	Symbol	Amplikon-länge (bp)	Katalognummer
Monoaminoxidase B	MAOB	119	QT00009870
Matrix Metalloproteinase 9	MMP9	115	QT00040040
Notch 2	NOTCH2	109	QT00072212
Paired box 7	PAX7	164	QT01888082
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha	PPARGC1A	134	QT00095578
Prostaglandin endoperoxide synthase 2	PTGS2	68	QT00040586
Ribosomal protein lateral stalk subunit P0	RPLP0	170	QT01839887
Sodium-coupled neutral amino acid transporter 2	SNAT2	105	QT00030499
Suppressor of cytokine signaling 3	SOCS3	112	QT00244580
TATA-box binding protein	TBP	132	QT00000721
Tumornekrosefaktor α	TNF α	104	QT01079561
Tripartite motif containing 63, E3 ubiquitin protein ligase	TRIM63 = MURF1	115	QT00039872
Vascular endothelial growth factor A	VEGFA	99	QT01682072
Vascular endothelial growth factor B	VEGFB	174	QT00013783

Alle verwendeten Primer wurden von der Firma Qiagen GmbH, Hilden; Deutschland gekauft.

2.1.3. Verwendete Kits

Name	Inhalt	Bezugsquelle
AffinityScript Multiple Temperature Reverse Transcriptase	Affinity Script Multiple Temperature Reverse Transcriptase 10x AffinityScript RT Buffer 100nM DTT	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent RNA 6000 Nano Chips Ladder DyeKonzentrat Marker Gel Matrix	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix	Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix Reference dye, ROX (1mm) 2x	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Pierce BCA Protein Assay Kit	BCA Reagent A BCA Reagent B Albumin Standard	Thermo Scientific, Pierce Biotechnology, Rockford, USA
Proteome Profiler Array Human XL Cytokine Array Kit	4 Human XL Cytokine Array nitrocellulose membranes spotted with 102 different antibodies to human cytokines Array Buffer 4 & 6 Wash Buffer Concentrate (25X) Detection Antibody Cocktail Streptavidin-HRP Chemi Reagent 1 & 2 4-Well Multi-dish Transparency Overlay Template	R&D Systems, Minneapolis, USA
Vectastain Elite ABC Kit (Standard)	Reagent A Reagent B	Vector Laboratories, Burlingame, USA

2.1.4. Reagenzien

Name	Bezugsquelle
10x Reaktionspuffer	Thermo Scientific, Waltham, USA
5- Sulfosalicylic acid dihydrate	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
70% Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Aceton	Merck, Darmstadt, Deutschland
Acetone for analysis	Acros organics, Geel, Belgium
Adenosin 5'-triphosphate disodium salt, Grade 1, minimum 99%	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ammoniumsulfid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ampuwa- Spüllösung (aqua ad iniectabilia steril pyrogen frei)	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland
Chloralhydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Chloroform for analysis	Merck, Darmstadt, Deutschland
Coomassie Brilliant Blue G-250 (Serva Blau G)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Complete, EDTA- free (Protease Inhibitor)	Roche, Basel, Schweiz
Diaminobenzidin (DAB, HRP- Substrat)	Roche, Mannheim, Deutschland
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
DNase I	Thermo Scientific, Waltham, USA
dNTP Mix	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
EDTA	Thermo Scientific, Waltham, USA
Eisessig	Merck, Darmstadt, Deutschland
Eosin Y	Merck, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure 100%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 100%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fertigpuffer A, B, C, D, E, F	Laborservice Onken, Gründau, Deutschland

Name	Bezugsquelle
Gelatine gepulvert	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol for analysis	Acros organics, Geel, Belgien
Kalialaun	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid	J.T. Baker Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Niederlande
Kaliumchrom-3-Sulfat reinst.	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kalziumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kobaltchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
KOH-Lösungen 3 Molar, 1 Molar (aus Kaliumhydroxide Pellets Baker Analyzed Reagent)	J.T. Baker Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Niederlande
Methanol p.a.	Merck, Darmstadt, Deutschland
Microscopy DEPEX Mounting Medium	VWR, Darmstadt, Deutschland
Microscopy Kaisers Glyceringelatine	Merck, Darmstadt, Deutschland
Milchpulver (fettarm) Blotting grade	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumjodat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natronlauge	Merck, Darmstadt, Deutschland
Oligo (dt)18 Primer	Thermo Scientific, Waltham, USA
Ovalbumin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dulbecco's Phosphatgepufferte Salzlösung ohne Ca ⁺⁺ Mg ⁺⁺ (PBS)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
peqGOLD TriFastTM	VWR, Darmstadt, Deutschland

Name	Bezugsquelle
pH-Lösungen pH 7.0, 4.0, 9.0	Merck, Darmstadt, Deutschland
Phloxin B	Merck, Darmstadt, Deutschland
Phosphorsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Probenpuffer PVP (=20% Thiodiglycol)	LaborService Onken, Gründau, Deutschland
Reaktorspüllösung W	LaborService Onken, Gründau, Deutschland
Reverse Transkriptase	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
RiboLock RNase Inhibitor	Thermo Scientific, Waltham, USA
RNase AWAY® (Dekontaminationslösung)	Molecular BioProducts, San Diego, USA
RNase/DNase freies Aqua = ultrapure Aqua	Gibco Life Technology, Thermo Scientific, Waltham, USA
Roti®-Histokitt	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tissue-Tek®	Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, Niederlande
Triton X-100	Merck, Darmstadt, Deutschland
Wasserstoffperoxid 100%	Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30%	Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Deutschland
Xylol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Zitronensäure	Merck, Darmstadt, Deutschland

2.1.5. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Name	Bezugsquelle
8er Kette opt. klar fl. Deckel	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
96 Multiply PCR-Platte natur	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Abzug Airflow-control EN 14175	Bense Laborbau, Hardeggen, Deutschland
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland

Name	Bezugsquelle
Analysewaage Mettler H6T	Mettler, Zürich, Schweiz
AxioCam HRc	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Biozym steril aerosol piper Tips (100µl)	Labcon, Petatuma, USA
Cap-It Positionierer	VWR, Erlangen, Deutschland
Chip Priming Station	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Combitips advanced, 0,5ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Deckgläschen, Menzel-Gläser 24x32, 24x36, 24x40	Thermo Fisher Scientific, Gerhard Menzel, Braunschweig, Deutschland
Dewar Transport Gefäß	KGW Isotherm, Karlsruhe, Deutschland
Eismaschine AF 103	Scotsman Ice Systems, Milan, Italien
Filter Tips (0,5-20ul)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Fireboy IBS	Integra Bioscience, Zizers, Schweiz
Fusion imaging system	VWR, Erlangen, Deutschland
Glaspipetten Pasteur Capillary Pipettes short size 150mm	WU, Mainz, Deutschland
Harmony Mixer Uzusio, VTX-3000L	Laboratory & Medical Supplies LTD., Tokyo, Japan
Heizblock, Grant-bio, Typ PHMT, Aufsatz: PSC-15, 20*1,5ml	Grant Instruments, LTD Shepreth, Cambridgeshire, England
Heraeus Biofuge Primo R Centrifuge	Thermo Scientific, Waltham, USA
Histoknife H	Heraeus Kulzer, Wehrheim, Deutschland
Imager M2 Zeiss	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Inkubationsschrank T6030	Hereus, Hanau, Deutschland
Keramikmörser und Keramikpistill	Sarstedt AG&Co, Nümbrecht, Deutschland
Kryostat Hyrax C60	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Laborglaswaren	Schott, Mainz, Deutschland
LC 3000 Amino Acid Analyzer	LaborService Onken, Gründau, Deutschland

Name	Bezugsquelle
Lichtmikroskop Cx21LED	Ernst Leitz, Wetzlar, Deutschland
Magnetrührer mit Heizung	IKA, Staufen, Deutschland
Magnetrührstäbchen	Brand, Wertheim, Deutschland
Menzel-Gläser Thermo Scientific	Gerhard Menzel, Braunschweig, Deutschland
Multipette plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Nano Drop 2000c Spektralphotometer	VWR, Erlangen, Deutschland
Perfect Spin P	VWR, Erlangen, Deutschland
pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin, Deutschland
Pico 17 centrifuge	Heraeus, Osterode, Deutschland
Pipetman	Gilson, Middleton, USA
Pipetten	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Pipettenspitzen, Ultratip	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Präzisionswaage Mettler K7T	Mettler, Zürich, Schweiz
PTC-200, Peltier Thermal Cycler	MJ Research, Watertown, USA
Rasierklinge Apollo	Herkenrath, Solingen, Deutschland
RNA Nano Chip	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Rocking Platform Shaker Promax 1020	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Safe-Lock Tubes	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
SafeSeal Micro Tubes	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Stratagene Mx3005P	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Sunrise ELISA-Reader	Tecan, Salzburg, Österreich
TipOne Graduated Filter Tips (1-200um)	Starlab, Ahrensburg, Deutschland
TKA MicroPur 08.1203	Thermo Fisher Scientific, TKA Wasseraufbereitungssysteme, Niederelbert, Deutschland
Ultraschall Erzeuger Sonoplus HD2070	Bandelin electronic, Berlin, Deutschland

Name	Bezugsquelle
Ultraschallstab UW2070	Bandelin electronic, Berlin, Deutschland
Ultraschallbad Sonorex Rk 100	Bandelin electronic, Berlin, Deutschland
Vakuum Konzentrator mit Kühlfalle	Bachofer, Reutlingen, Deutschland
Vortexer, Grant-bio, Typ PV-1	Grant Instruments, LTD Shepreth, Cambridgeshire, England
Waage, Kern 470	Kern und Sohn, Balingen, Deutschland

2.1.6. Software

Name	Bezugsquelle
2100 Expert	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
AxioVision 4.8	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Betriebssystem Windows 7	Microsoft, Redmond, USA
Clarity Lite 2.8.2.648	DataApex Ltd., Tschechische Republik
Fusion Advance-Capt V16.02	VWR, Erlangen, Deutschland
Image J	Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA
Microsoft Excel 2010	Microsoft, Redmond, USA
NormFinder.xla v0.953	Molecular Diagnostic Laboratory, Dept. of Clinical Biochemistry, Aarhus University Hospital, Dänemark
MxPro QPCR V4.10d	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA
XFluor4 ELISA-Reader V4.51	Männedorf, Schweiz

2.2. Methoden

2.2.1. Klinische Kooperationspartner

Kooperationspartner der Studie waren Prof. Dr. H. Friess und Prof. Dr. M. E. Martignoni der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie, Universitätsklinikum Heidelberg (Im Neuenheimer Feld 110, 69120 Heidelberg) bzw. weiterführend Prof. Dr. H. Friess und Prof. Dr. M. E. Martignoni der Chirurgischen Klinik und Poliklinik, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München (Ismaninger Straße 22, 81675 München). In diesen beiden Kliniken wurde (in den Zeiträumen 2004 - 2009 und 2008 - 2013) intraoperativ nach einem standardisierten Verfahren Proben aus dem M. rect. abd. entnommenen und der AG Medizinische Zellbiologie (Leitung Prof. Dr. Ralf Kinscherf), Institut für Anatomie und Zellbiologie in Marburg anteilig zur Forschung zur Verfügung gestellt.

2.2.2. Ethikanträge und Patientenrekrutierung

Die vorliegende klinische Querschnittstudie wurde im Rahmen der Anforderungen der aktualisierten Deklaration von Helsinki von 1964 des Weltärztebundes mit möglichst bestem klinischen und laboratorischen Wissen durchgeführt (World Medical Association 2013).

Entsprechend waren zwei Ethikanträge bei den jeweils lokalen universitären Ethikkommissionen erforderlich. In Heidelberg wurde von Prof. Dr. H. Friess und Prof. Dr. M. E. Martignoni der Ethikantrag zum „Aufbau einer Gewebebank für molekularbiologische Untersuchungen benigner und maligner Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes und endokriner Organe“ mit der Antragsnummer 301/2001 durch die Ethikkommission I der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg genehmigt. Ein positives Votum der Ethikkommission der TU München zum Projekt „Aufbau einer Gewebebank für molekularbiologische Untersuchungen bei mit Kachexie assoziierten benignen und malignen Erkrankungen des Thorax und Gastrointestinaltraktes“ (Projektnummer 1945/07) wurde von Prof. Dr. M. E. Martignoni beantragt und liegt seit 2008 vor. Am 14.03.2012 wurde von Prof. Dr. G. Richter, dem Vorsitzenden der

Ethikkommission der Philipps-Universität Marburg, in einem Schreiben ohne Aktenzeichen bestätigt, dass für die Forschungsprojekte in Marburg mit oben genannten Proben aus München und Heidelberg kein weiteres Ethikvotum nötig ist, da es sich hierbei um Kooperationen handelt.

Präoperativ haben die Patienten der Biopsie schriftlich zugestimmt. Die unterschriebenen Einwilligungserklärungen der Patienten wurden von Prof. Dr. M. E. Martignoni archiviert.

2.2.3. Gewebeproben

1-2 g des Skelettmuskels M. rect. abd. wurden standardisiert intraoperativ entnommen. Unmittelbar nach der Entnahme wurden die Proben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C asserviert.

Untersucht und verglichen wurden 36 Muskelbiopsien von Patienten mit intra- oder postoperativ histologisch gesichertem Pankreaskarzinom und Kachexie, definiert als eine ungewollte Gewichtsabnahme von mindestens 10% innerhalb von 6 Monaten (Tu+K+) und Patienten mit Pankreaskarzinom ohne Kachexie, definiert als fehlender Gewichtsverlust oder unter 10% ungewollte Gewichtsabnahme innerhalb von 6 Monaten (Tu+K-). Tu+K- ist in dieser Studie die Kontrolle.

Nach Anwendung der unten genannten Ein- und Ausschlusskriterien auf die vorhandenen Gewebeproben und Aufteilung des Gewebes auf die geplanten Methoden, ergaben sich folgende Gruppengrößen (N):

Tab. 2: Gruppengrößen bezüglich der angewendeten Methoden.

Methoden	N (gesamt)	N (Tu+K-)	N (Tu+K-/+)	N (Tu+K+)
(Immun-) Histochemie	15	9	-	6
ASA	32	19	-	13
PCR	21	10	-	11
Protein-Array	16	7	5	4

Voraussetzung für den Einschluss in die vorliegende Untersuchung waren ein/e

- unterschriebene Einwilligung zur Biopsie nach Aufklärung über den Eingriff
- vorhandene Muskelbiopsie
- histologisch gesichertes duktales Pankreaskarzinom

Ausschlusskriterien waren ein/e

- Zweittumor
- unvollständige klinische Datenerhebung
- eine schlechte Probenqualität oder falsches Gewebe
- Lebererkrankungen
- aktuelle Chemotherapie
- bekannte Myopathie (oder unklare CK-, oder Myoglobinerhöhung)
- bekannte kardiovaskuläre Erkrankung (Myokardinfarkt, Klappenvitium, Herzrhythmusstörungen, AVK)
- COPD
- chronische oder akute entzündliche Autoimmun- oder Infektionserkrankung.

2.2.4. Kryoschnitte

Die bei -80°C tiefgefrorenen Muskelproben (M. rect. abd.) wurden mit Tissue-Tek® aufgeblickt und quer zur Muskelfaserausrichtung mit dem Kryomikrotom bei -20°C 6-8µm dünne Schnitte angefertigt. Jeweils 3 dieser Schnitte wurden nebeneinander auf mit Chromalaungelatine beschichtete Objektträger, die bei -20°C gefroren waren, gezogen und anschließend bei -80°C gelagert oder direkt weiter verwendet. Die Beschichtung diente während den Färbungen der besseren Haftung der Gewebeschnitte auf den Objektträgern.

Chromalaungelatine:

1g	gepulverte Gelatine
0,1g	Kaliumchrom-III-Sulfat
200ml	Aqua dest. bei 40°C

Beschichtung der Objektträger mit Chromalaungelatine:

- 1) 1g gepulverte Gelatine in etwas von 200ml Aqua dest. mit Magnetrührer bei 40°C auflösen
- 2) Gelöste Gelatine und Kaliumchrom-III-Sulfat mit restlichem Aqua dest. verrühren
- 3) Objektträger vollständig in Lösung eintauchen, Überschuss mit fusselfreiem Papiertuch absaugen
- 4) Lufttrocknen, bei Raumtemperatur (RT) lagern

2.2.5. (Immun-) histologische Färbungen

2.2.5.1. Hämatoxylin-Eosin Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung) wurde zur Überprüfung des Gewebetyps, der Schnittqualität und der Muskelfaserausrichtung verwendet.

Die Objektträger mit den Gewebeschnitten wurden im basischen Hämalaun inkubiert, welches sich an die negativ geladenen Phosphatgruppen der Nukleinsäuren (DNA) im Zellkern anlagert. Zunächst färbten sich diese Strukturen rotbraun und erst durch eine pH-Wert Erhöhung unter fließendem Leitungswasser, dem sogenannten „Bläuen“, nahmen diese Strukturen die charakteristische blaue Färbung an. Anschließend wurden durch Eosin die positiv geladenen Proteine des Zytoplasmas, wie z.B. das glatte endoplasmatische Retikulum und die Mitochondrien rot-orange angefärbt (Mulisch und Welsch 2015, S. 201). Das überschüssige Eosin wurde mit Aqua dest. abgespült und die Gewebeschnitte in 96% Ethanol entwässert und mit Xylol geklärt. Zum Schluss wurden die Schnitte mit DEPEX und einem entsprechend großen Deckgläschen eingedeckt. Die auf Objektträger aufgezogenen Schnitte wurden unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Herstellung der Hämatoxylin- und Eosin-Färbelösung:

Hämalaun nach Mayer (1896):

0,1g	Hämatoxylin
0,02g	Natriumjodat
5,0g	Kalialaun
0,1g	Zitronensäure
5g	Chloralhydrat
100ml	Aqua dest.

Eosin:

100ml	1% Eosin Y (gelblich)
10ml	1% Phloxin B
780ml	96% Ethanol
4ml	Eisessig

Durchführung der HE-Färbung:

- | | | |
|----|----------------------------------|--------|
| 1) | Inkubation in Hämalun nach Mayer | 1 min |
| 2) | Bläuen mit Leitungswasser | 10 min |
| 3) | Inkubation in Eosin | 3 min |
| 4) | Waschen in Aqua dest. | |

Entwässerung:

- | | | |
|----|------------------|---------|
| 5) | Ethanol 96% | |
| 6) | Isopropylalkohol | 3x3 min |
| 7) | Xylol I | 3 min |
| 8) | Xylol II | 3 min |
| 9) | Xylol III | 3 min |

2.2.5.2. ATPase-Färbung

Die myofibrilläre Adenosintriphosphatase- (ATPase-) Färbung ermöglicht eine Typisierung der Muskelfasern nach den enzymatischen Eigenschaften des Myosins (Bachmann et al. 2013, S. 69). Aufgrund ihrer unterschiedlichen pH-Stabilität wird die ATPase des Myosins des Skelettmuskelfasertyps IIa durch saure Vorinkubation inaktiviert und kann somit kein ATP mehr umsetzen. Die ATPasen der Fasertypen IIx und I sind jedoch säureresistent und bleiben daher auch nach saurer Vorinkubation aktiv. Die ATPase des Typ I Myosins würde durch eine basische Vorinkubation inaktiviert werden. Die ATPase des Fasertyps I setzt mehr ATP um und färbt sich schwarz während sich Fasertyp IIx nur grau anfärbt (Brooke und Kaiser 1970).

Die Typisierung der Muskelfasern erfolgte nach einem modifizierten ATPase-Färbeprotokoll, das ursprünglich von Padykula und Herman (1955), sowie Brooke und Kaiser (1970) entwickelt wurde. Mit Probeschnitten der Gewebe wurde der optimale saure pH-Wert zur Unterscheidung der Fasertypen ermittelt (zwischen 4,65 und 4,8) und mit diesem alle weiteren Gewebeschnitte angefärbt. Nach der sauren Vorinkubation und anschließendem Spülen im Ausgleichspuffer wurden die Schnitte der ATPase

Reaktion ausgesetzt. Die ATPase katalysiert die Hydrolyse-reaktion: $\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{ADP} + \text{P}$. Überschüssiges ATP wurde durch Spülen mit Kalziumchlorid entfernt. Das in den Muskelfasertyp I bei der Reaktion gebildete Phosphat blieb gebunden und wurde anschließend mit Kobalt(II)-Chlorid komplexiert. Mit Aqua dest. wurde der Kobaltüberschuss entfernt. Durch Zufügen von Ammoniumsulfid fiel das Kobaltsulfid aus und es kam zu einem dunklen, amorphen Niederschlag in den Fasern des Typs I, während die schnellen Fasern des Typs IIx intermediär gefärbt wurden. Die Fasern des Typs IIa blieben ungefärbt hell.

Nach nochmaligem Spülen der Gewebeschnitte in Aqua dest. wurden diese mit bei 40°C verflüssigter Kaisers Glyceringelatine und einem passenden Deckgläschen eingedeckt.

Jede Inkubation fand bei Raumtemperatur statt und die Objektträger wurden nach diesen jeweils bestmöglich abgetrocknet, um die Inkubationslösungen nicht mit vorherigen Lösungen zu verunreinigen.

Herstellung der Verbrauchslösungen:

Saure Lösung:

7,46g	Kaliumchlorid
900ml	Ampuwa®
3,6ml	Essigsäure 100%

Mit Kaliumhydroxid 3M und 1M auf einen pH-Wert von 4,3 titrieren, danach mit Ampuwa® (RNase freies, destilliertes Wasser) auf 1000ml auffüllen.

Auf 4 Bechergläser aufteilen und mit Kaliumhydroxid 3M und 1M auf saure pH-Werte von 4,65; 4,7; 4,75; 4,8 titrieren. Testen des optimalen sauren pH-Wertes, anschließend 200ml der Lösung auf diesen pH-Wert titrieren.

Ausgleichspuffer:

0,751g Glycin

0,735g Kalziumchlorid

200ml Ampuwa®

Mit Kaliumhydroxid 3M und 1M auf einen pH-Wert von 9,4 einstellen, danach mit Ampuwa® auf 250ml auffüllen.

50ml davon abfüllen und auf einen pH-Wert von 9,7 titrieren

ATPase Lösung:

10ml Ausgleichspuffer (pH-Wert 9,7)

0,015g ATPase

1% Kalziumchlorid:

2g Kalziumchlorid

200ml Ampuwa®

2 % Kobaltchlorid:

4g Kobaltchlorid

200ml Ampuwa®

1% Ammoniumsulfid (unter Lichtausschluss lagern):

1g Ammoniumsulfid

100ml Ampuwa®

Durchführung:

- | | | |
|----|---|----------|
| 1) | Vorinkubation bei optimalen pH-Wert (zwischen 4,65 und 4,8) | 5 min |
| 2) | Inkubation im Ausgleichspuffer | 1 min |
| 3) | Inkubation mit ATPase in feuchter Kammer | 20 min |
| 4) | Spülen mit 1% CaCl ₂ | 3x30 sec |

5)	Inkubation in 2 % CoCl ₂	3 min
6)	Spülen mit Aqua dest.	3x30 sec
7)	Inkubation in 1% Ammoniumsulfid	1 min
8)	Spülen mit Aqua dest.	2x1 min

2.2.5.3. CD31 Färbung

Zur Immunlokalisation der Kapillaren in den 7µm Kryoschnitten der Skelettmuskulatur wurde das Cluster of Differentiation 31 (CD31) als Antigen gewählt. Es ist ein spezifischer und empfindlicher Marker für humane Gefäßendothelzellen (Muller et al. 1989). Es wird auch Platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM1) genannt, gehört zu der Immunglobulin-Superfamilie und ist hauptsächlich für die Zell-Zell-Adhäsion verantwortlich (Albelda et al. 1991). Die immunhistochemische Färbung basiert auf dem Prinzip, dass spezifische Strukturen mit Hilfe von Antikörpern (AK) dargestellt und lokalisiert werden können.

Die CD31 Färbung wurde nach einem Protokoll, das von Mitarbeitern des Instituts für Anatomie und Zellbiologie III in Heidelberg entwickelt wurde, durchgeführt. Zunächst wurde die gewebeständige Peroxidase mit Wasserstoffperoxid geblockt. Unspezifische Proteinbindungsstellen des Gewebes wurden durch Inkubation mit PBS verdünnten Milchpulver (1:100) für 25 Minuten bei Raumtemperatur abgesättigt. Um den dann zugegebenen Primärantikörper gegen CD31 sichtbar zu machen, wurde das Vectastain® ABC Kit verwendet. Zum Primärantikörper wird zunächst der biotinylierte Sekundärantikörper dazugegeben, an den das Vectastain-Reagent, ein Komplex aus Avidin- und Biotin- konjugierter Meerrettichperoxidase (Enzym), bindet. Ein Vorteil der ABC Technik ist die Signalverstärkung, welche dadurch ermöglicht wird, dass das im Vectastain-Reagent enthaltene Glykoprotein Avidin 4 Bindungsstellen für Biotin aufweist (Mulisch und Welsch 2015, S. 425) (Abb. 3). Die Meerrettichperoxidase reagiert mit ihrem Substrat, dem zugegeben Wasserstoffperoxid. Die dadurch freigesetzten Protonen oxidieren das Chromogen 3–3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB), sodass das Antigen durch braune Niederschlagsbildung am Bindungsort des Primärantikörpers sichtbar wird.

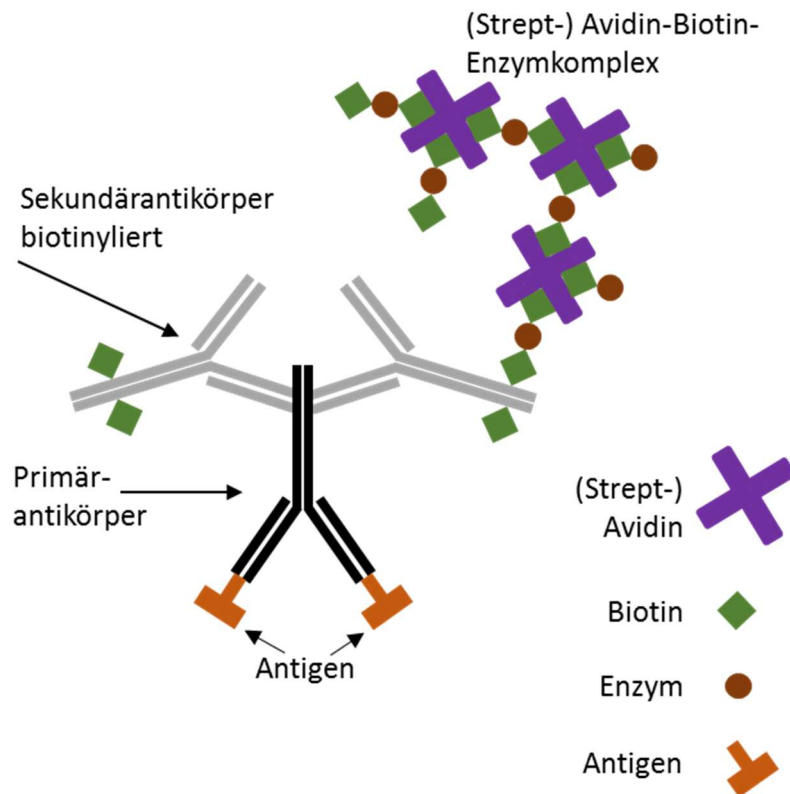


Abb. 3: Schema der ABC-Technik (Modifiziert nach Mulisch und Welsch 2015).

Zum Schluss wurden die Zellkerne in einem Hämalaunbad nach Mayer (1896) gegengefärbt, die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und abschließend mit Roti®-Histokitt eingedeckt.

Die optimale Verdünnung für die Antikörper wurde zuvor an humanen Muskelgewebeschnitten getestet. Alle Schritte, außer der Inkubation mit dem ersten Antikörper (37°C im Inkubator), fanden bei Raumtemperatur statt. Die Inkubationsschritte wurden wegen der Gefahr der Austrocknung der Gewebeschnitte in einer feuchten Kammer durchgeführt. Diese bestand aus einer Kunststoffschale mit Deckel, in der mit Aqua dest. befeuchtete Tücher ausgelegt waren, auf denen auf Glasstäben die Objektträger mit den Schnitten aufgereiht waren. Nach den Waschvorgängen wurde die Flüssigkeit von jedem Objektträger abgesaugt, um die darauf folgende Inkubation nicht zu verdünnen. Auf die Negativkontrollen wurde PBS-Puffer statt des Primärantikörpers aufgetragen.

Herstellung von 2l PBS-Puffer:

17,4g	Natriumchlorid
0,6g	Kaliumdihydrogenphosphat
2,8g	di-Natrium-Hydrogenphosphat-Dihydrat
0,4g	Kaliumchlorid
ad 2 l	Aqua dest

Durchführung:

1)	Fixieren in Aceton	12 min
2)	Spülen mit PBS	2x5 min
3)	Abgedunkelt blocken in 50ml 3% H ₂ O ₂ mit 200ml Methanol	25 min
4)	Spülen mit PBS	2x5 min
5)	Inkubation mit dem Fremdprotein 1% Milchpulver	25 min
6)	Inkubation mit CD31 Primär-AK (1:300) bei 37°C	110 min
7)	Spülen mit PBS	3x5 min
8)	Inkubation mit Sekundär-Antikörper (1:250)	60 min
9)	Spülen mit PBS	2x5 min
10)	Inkubation mit Vectastain Probe A (Avidin) und Probe B (Biotin) (1:300)	45 min
11)	Spülen mit PBS	2x5 min
12)	Färben mit DAB (3,3 – Diaminobenzidin –Tetrahydrochlorid) (1:10) und 100µl 30% H ₂ O ₂	6 min
13)	Spülen mit Aqua dest.	5 min
14)	Kerngegenfärbung mit Hämatoxylin	1 min
15)	Bläuen mit Leitungswasser	20 min
16)	Spülen mit Aqua dest.	
17)	Ethanol 50%	3 min
18)	Ethanol 80%	3 min
19)	Ethanol 96%	2x3 min
20)	Isopropylalkohol	3x3 min
21)	Xylol	3x3 min

2.2.5.4. Auswertung

Um die Anzahl der Kapillarkontakte und den Fasertyp für eine identische Faser bestimmen zu können, wurden zwei direkt nacheinander seriell angefertigte Gewebeschnitte immunhistochemisch (CD31) und histochemisch (ATPase) angefärbt, in einer 10er Vergrößerung fotografiert, mit Image J ausgewertet (Abb. 4 und Abb. 5) und zur Faseridentifikation miteinander verglichen. Dieselben Muskelfaseranschnitte beider Färbungen wurden mit übereinstimmender Nummer einander zugeordnet. Es wurden je Probe ca. 100 Muskelfasern in benachbarten Kryoschnitten im intakten Gewebezusammenhang, welche jeweils vollständig abgebildet waren, ausgewertet. Im Falle, wo dieses nicht auf einer Aufnahme möglich war, wurden mehrere Ausschnitte einer Probe fotografiert.

Die Muskelfaserquerschnitte wurden einzeln mit dem Auswahlinstrument „polygon“ in Image J durch Umfahren der Zellmembran als Fläche im Präparat manuell quantifiziert (Abb. 4). Zudem wurde die Flächensumme der mit ihnen im Zusammenhang stehenden Fasern bestimmt, wobei die Flächen von Lücken und Rissen innerhalb der ausgewerteten Gesamtfläche abgezogen wurden.

Für eine exakte Auswertung im Faserquerschnitt wurde im 90° Winkel zur Faserverlaufsrichtung geschnitten. Dies würde im Ideal, bei parallel-verlaufenden, kreisrunden Fasern, im Querschnitt ein Seitenverhältnis des Längs- zu Querdurchmesser von 1:1 ergeben. Jedoch liegen nicht alle Muskelfasern exakt parallel und sind auch nicht immer kreisrund. Um das tatsächliche Seitenverhältnis zu berechnen, wurde der maximale Durchmesser (in Image J als „Feret“ bezeichnet) und der im 90° Winkel darauf stehende kleinste Durchmesser („Min Feret“) der Muskelfaser gemessen und diese durcheinander dividiert. Es wurden nur Fasern mit einem Seitenverhältnis von 1:1 bis 2:1 berücksichtigt. Die Anzahl und Flächen aller schräg angeschnittenen Fasern, definiert als Seitenverhältnis von über 2:1, wurden abgezogen. Dies waren im Mittel 29% der Fasern pro Probe. Durchschnittlich konnten 69 Fasern pro Probe ausgewertet werden.

Des Weiteren wurden die Gefäßkontakte, d.h. die Gefäße, die mit den jeweilig gemessenen Muskelfaseranschnitten unmittelbar im Kontakt stehen, unterteilt in Kapillaren mit einem Gefäßdurchmesser unter 10µm und vorgeschaltete (präkapilläre)

Gefäßanschnitte ab einem Gefäßdurchmesser von 10µm, gezählt. Außerdem wurden die Muskelfasern mit zentralisierten Zellkernen gezählt (Abb. 6, links) und dem Muskelfasertyp bzw. der Fasernummer zugeordnet.

In den (benachbarten) ATPase-angefärbten Kryoschnitten wurden den Muskelfaseranschnitten die Fasertypen zugeordnet: Dunkel angefärbt sind Skelettmuskelfaseranschnitte des Fasertyps I, mittel braun abgebildet ist der Fasertyp IIx und die hellen Anschnitte sind Fasertyp IIa zugehörig (Abb. 6, rechts). Mögliche Hybridfasertypen wurden unter Fasertyp I oder IIx subsummiert.

Zur Auswertung wurden die Daten in Microsoft Excel-Tabellen übertragen und statistisch aufgearbeitet.

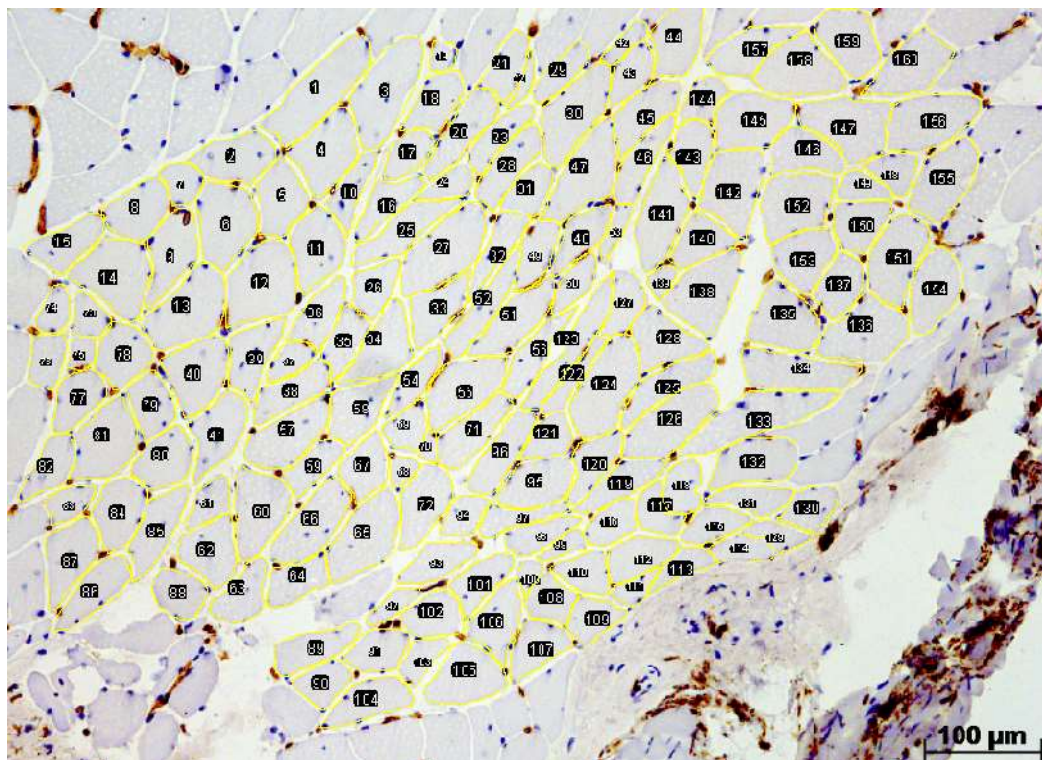


Abb. 4: Exemplarische CD31 Färbung und Auswertung (Probe: HD 805-2).

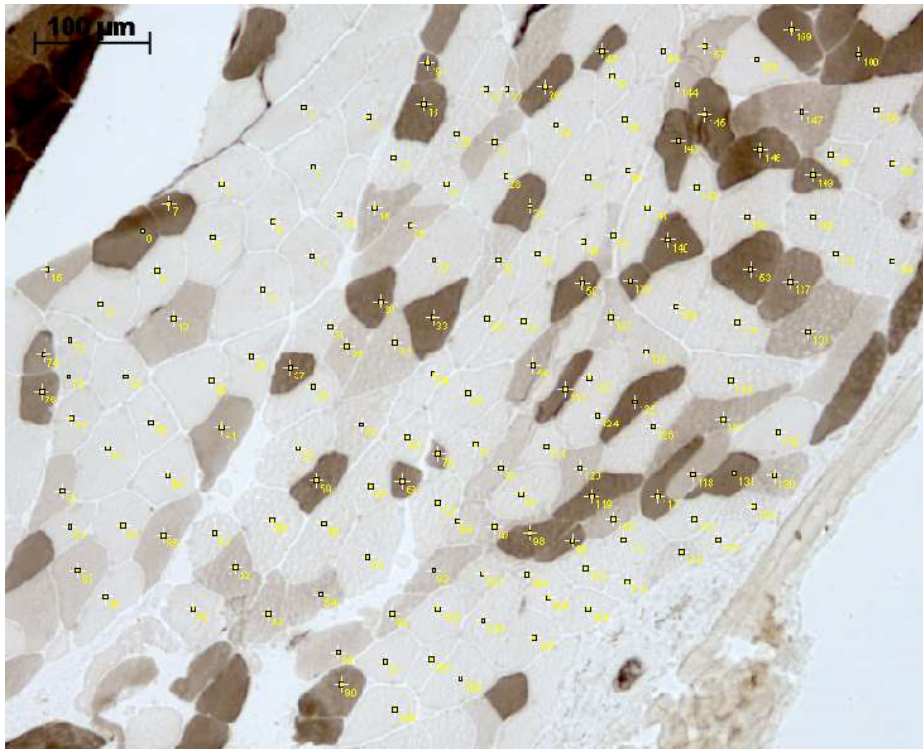


Abb. 5: Exemplarische ATPase Färbung und Auswertung (Probe: HD 805-2).

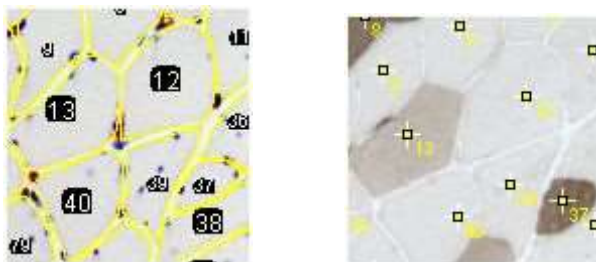


Abb. 6: Exemplarische CD31 und ATPase Färbung (Probe HD805-2 gleicher Ausschnitt in zwei Färbungen).

Links: CD31 Färbung: Faser 13 mit 2 Kapillarkontakten, Faser 12 mit 3 Kapillarkontakten, Faser 39 und 40 mit zentralisierten Zellkernen.

Rechts: ATPase Färbung: Fasertypbestimmung: Faser 13 Fasertyp IIx, Faser 12, 40, 39 Fasertyp IIa, Faser 37 Fasertyp I.

2.2.6. Aminosäureanalyse (ASA)

Unter Verwendung des LC 3000 Amino Acid Analyzer wurde die Menge intrazellulär vorkommender Aminosäuren durch chromatographische Auftrennung analysiert.

2.2.6.1. Probenvorbereitung

Auf einer mit RNase AWAY und 70% Alkohol gereinigten und zuvor in Flüssigstickstoff gefrorenen Platte, wurden mit einer ebenfalls gefrorenen Rasierklinge die nach den angefertigten Kryoschnitten übrig gebliebenen Gewebeprobestücke von Tissue-Tek® befreit und in gefrorenen Porzellan-Mörsern mit Porzellan-Pistill pulverisiert. Die so gewonnen Proben wurden im Verhältnis 1/3 zu 2/3 auf 2 Reaktionsgefäße aufgeteilt und bis zur weiteren Aufbereitung bei -80°C tiefgefroren gelagert. Der kleinere Anteil hiervon wurde für die Aminosäureanalyse (ASA) verwendet, der Rest für die Genexpressions- und die Proteomanalyse.

2.2.6.2. Chromatographie

Die ASA mit dem LC 3000 Amino Acid Analyzer funktioniert nach dem Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Verfahren (HLPC-Verfahren) auf der Basis des Ionenaustauscherprinzip (Gröger et al. 2013, S. 8). Dabei werden die Aminosäuren über eine Kationenaustauschersäule in Lithiumform mittels Stufengradient und Temperaturvariationen aufgetrennt, anschließend mit dem Derivatisierungsreagenz Ninhydrin umgesetzt, um sie photometrisch aufgrund ihrer Extinktion bei 440nm und 570nm detektieren zu können. Die Aminosäurekonzentration wurde mit der Clarity Lite Software, Version 2.8.2.648, berechnet.

Durchführung:

- 1) Proteine mit 500µl 2,5% 5-Sulfosalicylsäure Dihydrat Lösung ausfällen
- 2) Integrität der Zellen durch Ultraschallbad zerstören 5 sec
- 3) Zentrifugieren bei 2580 x g 10 min
Protein Pellet für Bradford-Proteintest verwenden
- 4) Aminosäuren im Überstand mit 50µl saurem Probenpuffer
(2% Thiodiglycol) verdünnen
- 5) Zentrifugieren bei 10000 x g 10 min
- 6) 150µl des Überstands für die ASA abpipettieren
- 7) Mit HLPC photometrisch die Extinktion bei 440nm und 570nm detektieren

2.2.6.3. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Proteinkonzentrationen wurden mit einem Spektralphotometer nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt.

Der Reagenzfarbstoff Coomassie Brilliant Blue bindet die Proteine und hierbei verschiebt sich das Absorptionsmaximum gegenüber dem freien Farbstoffs von 470nm auf ein Absorptionsmaximum des Farbstoff-Protein-Komplexes von 595nm.

Die Extinktion bei 595nm ist proportional zur Proteinkonzentration in der Probe. Durch Vergleich der Extinktion bei 595nm der Probe zu einer Standardkurve, generiert aus einer Serie von Proteinlösungen mit bekannten Konzentrationen, wird die Proteinkonzentration der Probe interpoliert. (Stephenson 2010, S. 385).

Protein-Standardlösung mit Ovalbuminlösung in H₂O:

0 mg/ml; 0,2 mg/ml; 0,4 mg/ml; 0,6 mg/ml; 1 mg/ml

Bradford-Lösung ansetzen:

50mg Coomassie Brilliant Blue G-250 (Serva Blau G)
25ml 100% Ethanol
50ml Phosphorsäure
ad 500ml Aqua dest

Durchführung:

- 1) 500µl 0,1 molare Natronlauge auf das Proteinpellet
- 2) mit Vortex homogenisieren 10 min
- 3) 1 ml Bradford-Lösung und je 10µl Protein-Standardlösung (Referenzwert),
Probe oder H₂O (Blindwert)
- 4) vortexen
- 5) bei RT stehen lassen 30 min
- 6) Extinktion bei 595nm messen

2.2.6.4. Auswertung

Nachdem die Menge der säurelöslichen freien Aminosäuren mit dem LC 3000 Amino Acid Analyzer sowie die Proteinmenge mit dem Bradford-Test an demselben Muskelprobenvolumen bestimmt waren, konnte die Konzentration der freien Aminosäuren als nmol pro mg Protein berechnet werden. Mit dieser quantitativen Größe konnten die Gruppen verglichen werden.

2.2.7. Genexpressionsanalyse anhand qRT-PCR

Mit Hilfe der qRT-PCR kann die Genexpression ausgewählter Gene quantitativ bestimmt und die Expressionsmuster unterschiedlicher Proben verglichen werden. Hierzu wird zunächst die Gesamt-RNA extrahiert und anschließend der mRNA-Anteil mit Hilfe der reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Abschließend erfolgt mittels quantitativer Echtzeit-PCR eine Amplifikation ausgewählter Gene bzw. der erstellten

cDNA, die eine Beurteilung der ursprünglichen Genexpressionsmuster sowohl qualitativ als auch quantitativ zulässt.

2.2.7.1. RNA-Extraktion

2.2.7.1.1. Homogenisierung

Die gemörserten Proben wurden in 1000µl peqGOLD TriFast™ Extraktionspuffer, welcher Phenol und Guanidinisothiocyanat enthält, aufgenommen und mit dünnen Kanülen mehrmals aufgezogen, um die Proben durch die Scherkraft zu verflüssigen. Anschließend konnten die Proben bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden oder direkt damit weiter gearbeitet werden.

- 1) Gewebe in 1000µl peqGOLD TriFast™ aufgenommen
- 2) Homogenisiert und lysiert durch mehrmaliges Aufziehen mit dünnen Kanülen

2.2.7.1.2. Phasentrennung

Durch Zugabe von Chloroform und Ausschütteln kommt es durch anschließendes Zentrifugieren zu einer Phasentrennung. Es bildet sich zuoberst die farblose wässrige Phase, in der sich die RNA befindet, es folgt die Interphase und zuunterst die rote Phenol-Chloroform-Phase. In den beiden unteren Schichten befinden sich die Proteine und die DNA (Chomczynski und Sacchi 1987), die für die spätere Proteinextraktion bei 4°C aufbewahrt wurden.

- | | | |
|----|--|-------|
| 3) | Bei RT stehen lassen | 5min |
| 4) | 200µl Chloroform dazugeben, 40x schütteln | |
| 5) | Bei RT stehen lassen | 5 min |
| 6) | Mit 12000 x g bei 4°C zentrifugieren | 5 min |
| 7) | Oberste Phase abpipettieren und in neues Reaktionsgefäß überführen | |

- 8) Rest für Proteinextraktion bei 4°C lagern
- 9) Schritt 4-7 wiederholen

2.2.7.1.3. RNA-Präzipitation

Nach Zugabe von Isopropanol zur wässrigen Phase fällt die Gesamt-RNA aus und kann nach Zentrifugieren, Reinigen und Trocknen des RNA-Pellets wieder gelöst und stabil bei -80°C gelagert werden.

- 10) 500µl 100% Isopropanol dazu geben, schütteln
- 11) Auf Eis stellen 15 min
- 12) Zentrifugieren bei 4°C mit 13000 x g 30 min
- 13) Überstand dekantieren

Waschen der RNA:

- 14) 500µl 70% Ethanol hinzugeben, schütteln
- 15) Zentrifugieren bei 4°C bei 13000 x g 5 min
- 16) Überstand dekantieren
- 17) Schritt 14-16 wiederholen
- 18) RNA-Pellet unter dem Abzug trocknen lassen

Lösen der RNA:

- 19) 1µl RiboLock (RNase Inhibitor) (1:100 verdünnt mit Aqua u.p.)
hinzugeben
- 20) Mit Heizblock auf 60°C zum besseren Lösen erwärmen 10 min
- 21) RNA bis zur weiteren Verwendung bei -80°C lagern

2.2.7.1.4. RNA Reinheits- und Konzentrationsbestimmung

Zur Abschätzung der RNA-Reinheit wurde mit dem NanoDrop 2000 Spektralphotometer der Quotient der Absorption bei 260nm und 280nm bestimmt. Ein Quotient von 2,0 wird allgemein als Wert für eine reine RNA ohne Verunreinigungen mit Protein und Lösungsmitteln angesehen, da Nukleinsäuren ihr Absorptionsmaximum bei 260nm und Proteine bei 280nm haben. Weiterhin kann über die optische Dichte bei 260nm (OD_{260}) die Konzentration an RNA in der Lösung bestimmt werden. Dabei entspricht 1,0 OD_{260} etwa 40µg/ml RNA. Nach Messung der OD_{260} wurden die Proben mit RNase freiem Aqua dest. auf 1µg/7,5µl RNA eingestellt. Weiterhin wurde durch Mischung von jeweils einem Aliquot aller Proben ein Analyse-Standard mit ebenfalls 1µg/ml RNA erstellt.

- 22) RNA auftauen lassen
- 23) Kurz an zentrifugieren
- 24) Auf Messsonde des NanoDrop™ 2000 1,1µl Probe aufgetragen, messen

2.2.7.1.5. RNA-Qualitätsbestimmung

Zur RNA-Qualitätsbestimmung, auch Integritätsbestimmung genannt, wurde das Agilent RNA 6000 Nano Kit mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer verwendet und nach der beiliegenden Anleitung vorgegangen. Diese Messung ist eine standardisierte RNA Qualitätskontrolle, da sie durch die Automatisierung Untersucher-unabhängig ist. In der Kapillargelelektrophorese werden die Fraktionen der rRNA (5s, 18S, 28S), die mRNA und die fragmentierte RNA der Größe nach aufgetrennt und in einem Elektropherogramm und als Bandendarstellung ausgegeben. Die Maßeinheit für das Ergebnis ist die RNA-Integritätsnummer (RIN). Der maximale Wert von 10 repräsentiert eine intakte, nicht degradierte und nicht fragmentierte RNA von sehr hoher Qualität, und 1 steht für eine komplett degradierte und fragmentierte RNA mit geringster Qualität (Schroeder et al. 2006). Die Qualität der untersuchten Muskelproben lag im Durchschnitt bei einem RIN-Wert von 7. Proben mit einem RIN-Wert unter 6 wurden verworfen.

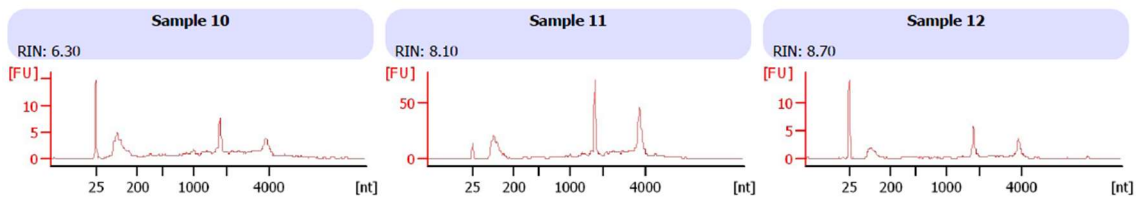


Abb. 7: Beispiel der RIN-Qualität von 3 Proben im Elektropherogramm (FU = Fluoreszenz).

2.2.7.2. DNase Verdau

Bevor die RNA in DNA umgeschrieben wurde, wurden mit DNase I eventuelle Verunreinigungen durch genomische DNA abgebaut. Die Reaktion wurde durch den Komplexbildner EDTA, der Magnesium bindet, gestoppt und verbliebene DNase durch Erwärmung inaktiviert.

- 25) Zu 1µg RNA (=7,5µl Probe)
- 26) 1µl 10x Reaktionspuffer und
- 27) 1,5µl DNase I hinzugeben
- 28) Inkubieren bei 37°C 30 min
- 29) Mit 1µl 50mM EDTA Reaktion stoppen
- 30) Inaktivieren bei 65°C 10 min
- 31) Auf Eis stellen

2.2.7.3. cDNA Synthese

Das Enzym reverse Transkriptase kann die mRNA in die komplementäre DNA umschreiben. Als Startpunkt dienen Oligo dT₁₈ Primer und als Substrate dNTPs (Temin und Mizutani 1970; Baltimore 1970).

- | | | |
|-----|---|--------|
| 32) | 11µl RNA-Probe bzw. Analyse-Standard, 1µl Oligo dT ₁₈ und
1,7µl Aqua u.p. mischen | |
| 33) | Inkubieren bei 65°C | 5 min |
| 34) | Bei RT stehen lassen | 10 min |
| 35) | 2µl 10x A Script Puffer; 2µl 100mM DTT; 0,5µl RiboLock;
0,8µl 100mM dNTP Mix; 1µl reverse Transkriptase hinzugeben | |
| 36) | Inkubieren bei 42°C | 60 min |
| 37) | Inaktivieren bei 70°C | 15 min |
| 38) | Auf Eis stellen | |

Nach erfolgter Reaktion wurden die Reaktionsvolumina (20 µl) der Proben für die spätere PCR mit RNase- und DNase- freiem Wasser auf 1:20 verdünnt.

Der Analyse-Standard (Pool aller Proben) wurde auf 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 und 1:320 verdünnt. Mit diesen Proben konnte entweder direkt weiter gearbeitet werden oder sie wurden bei -20°C eingefroren.

2.2.7.4. Quantitative Echtzeit-Reverse Transkription- Polymerasekettenreaktion

Mit der quantitativen Echtzeit-Reverse-Transkription-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) kann die Menge und Zusammensetzung der mRNA, d.h. die Expressionsmuster für ausgewählte Gene in den Muskelproben, quantifiziert werden. Ausgangsmaterial für die PCR war die zuvor erstellte cDNA. Für jedes zu untersuchende Gen wurde ein eigener PCR-Ansatz erstellt, wobei nur die dem Gen (Primer) entsprechende cDNA als Template (Matrize für die DNA Polymerase) fungieren kann. In jedem Zyklus der PCR werden die anfänglich sehr geringen Mengen an cDNA verdoppelt. Fluoreszenzmoleküle wie z.B. das in der Untersuchung eingesetzte SYBR Green lagern sich in die DNA ein (interkalieren), wodurch die Fluoreszenz dieser Farbstoffe bei Anregung (589nm) entsteht. Der DNA-Fluoreszenz-Komplex emittiert Licht der Wellenlänge 521nm. Die Extinktion bei 521nm korreliert proportional zur Quantität der Amplifikate (Ganten et al. 2013, S. 96) und wird

in jedem Zyklus am Ende der Elongationsphase in Echtzeit detektiert. Die Anzahl der Zykluswiederholungen bei der die Fluoreszenz erstmals signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt, wird bestimmt und als cycle threshold (C_t) bezeichnet (Jansohn und Rothhämel 2012, S. 152). Die Bestimmung des C_t -Wertes wird einer Endzeitpunkt-Messung vorgezogen, da nur in der exponentiellen Amplifikationsphase der PCR ein quantifizierbarer Anstieg gewährleistet ist. Sind nur wenige Zyklen notwendig, um den Schwellenwert zu überschreiten, ist der C_t -Wert klein und es war eine größere Ausgangsmenge cDNA (der entsprechenden mRNA) in der Probe vorhanden.

Die Messung der mRNA Expressionslevel erfolgte mit dem Stratagene Mx3005P qPCR System nach folgendem Temperaturprofil:

Tab. 3: qRT-PCR: Temperaturprofil

	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	3 min	1
Denaturierung	95°C	10 sec	42
Anlagerung und Elongation	60°C	20 sec	
Dissoziationskurve	95°C	1 min	1
	55°C	30 sec	} 20 min 1
	bis	...	
	95°C	30 sec	

Als Negativkontrolle wurde Aqua u.p. statt der cDNA der Proben eingesetzt.

Master-Mix-Dye Mischung ansetzen:

2ml Brilliant III Ultra Fast SYBR Green QPCR Master Mix
 6µl Reference Dye (ROX) 1:100 verdünnt mit Aqua u.p.

Master Mix-Dye-Aqua u.p.–Primer Mischung ansetzen:

- 7,5µl der obigen Master Mix-Dye-Mischung
- 1µl Aqua u.p.
- 1,5µl des jeweiligen zu untersuchenden Primers

Durchführung:

- 39) Die cDNA wurde aufgetaut und gevortext
- 40) 5µl jeder Probe bzw. jeder Verdünnung des Standard in jeweils 2 Wells der 96 Well PCR-Platte vorlegen
- 41) 10µl der Master Mix-Dye-Aqua u.p.–Primer-Mischung hinzufügen
- 42) fertige 96 Well PCR-Platte luftdicht verschließen
- 43) bei 500 x g zentrifugieren 1 min
- 44) Genexpression mit Stratagene Mx3005P qPCR Systems messen

Nach Abschluss der eigentlichen qPCR wurde mit Hilfe einer Dissoziationskurve auf nicht-spezifische Amplifikationsprodukte geprüft (Jansohn und Rothhämel 2012, S. 168). Durch langsames Erhitzen kommt es für jedes Amplikon (DNA-Fragment) bei einer bekannten, spezifischen Temperatur zur Denaturierung und Auftrennung der DNA-Doppelstränge bei gleichzeitiger Freisetzung des SYBR Green Fluoreszenzfarbstoffes. Die Überprüfung der Dissoziationskurve und somit des Verlaufs der Fluoreszenz bis zur vollständigen Denaturierung aller doppelsträngiger DNA Moleküle der Reaktion diente somit der Verifizierung, dass keine unspezifischen Signale detektiert wurden. Weiterhin wurden mit dem zugegeben passiven Referenzfarbstoffes ROX PCR-unspezifischen Fluoreszenzsignalen, die sich z.B. durch unterschiedliche Füllhöhen der PCR-Kavitäten (=Wells) ergeben können, kompensiert.

Tab. 4 listet die untersuchten Zielgene auf, sowie die als Referenzgene in die Untersuchung einbezogenen Housekeeping-Gene. Housekeeping-Gene werden definitionsgemäß im Gegensatz zu regulierten Genen unabhängig von äußeren oder experimentellen Einflüssen und vom Zelltyp immer in gleicher Menge exprimiert, da sie

für Strukturmoleküle und Enzyme des Intermediärstoffwechsels kodieren (Koolman und Röhm 2009, S. 244). Dies wird zur Normierung der einzelnen Proben genutzt.

Tab. 4: Auflistung der untersuchten Primer für die Expressionsanalyse.

Funktion	Genkodierung
Apoptose	<i>BAX; CASP3</i>
Anti-Apoptose	<i>BCL-2</i>
Inflammation	<i>CD68 ; IL1B ; IL6 ; IL8 ; GDF15; PTGS2; SOCS3; TNF</i>
Glutathionsstoffwechsel	<i>GCS; GSR</i>
Monoaminoxidasen	<i>MAOA; MAOB</i>
Myogenese	<i>NOTCH1; NOTCH2; PAX7</i>
Proteosomale Aktivität	<i>FBXO32; MMP9; PPARGC1A; TRIM63</i>
Aminosäure-Transporter	<i>LAT1; SNAT2</i>
Angiogenese	<i>KDR; VEGFA; VEGFB</i>
Housekeeping-Gene	<i>ACTB; RPLP0; TBP</i>

2.2.7.5. Auswertung

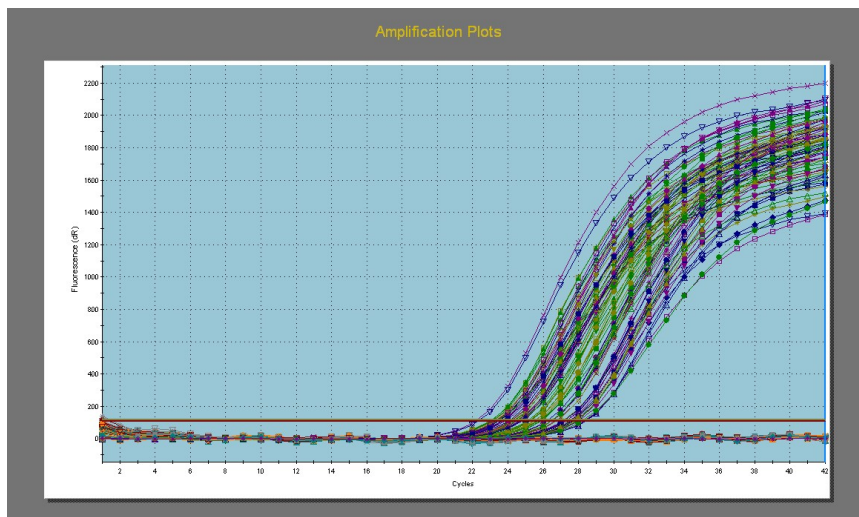
Die Expressionslevels der Gene von Interesse werden mit der Software MxPro QPCR berechnet. Zur Bestimmung der C_t -Werte berechnet die Software anhand interner Algorithmen für jede PCR Platte (Genanalyse) die Basislinie der Fluoreszenz, bei deren Überschreiten der C_t abgelesen wird.

Die relative Quantifizierung der Daten erfolgte durch Anwendung der Standardkurvenmethode. Hierzu wird zunächst eine Standardkurve erstellt, indem der Analyse-Standard in den oben beschriebenen Verdünnungsstufen amplifiziert und die resultierenden C_t -Werte gegen den dekadischen Logarithmus der Verdünnungsstufen

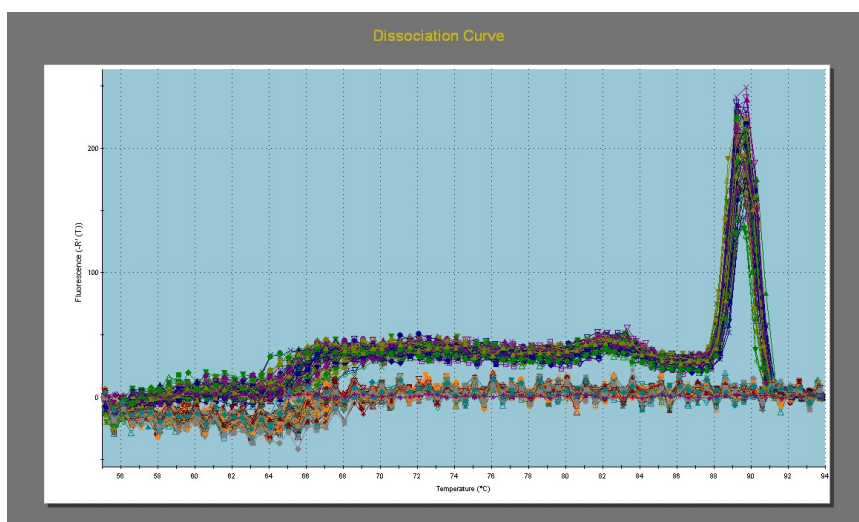
aufgetragen werden. Dann kann die relative Ausgangsmenge der Zielsequenz in allen Proben mittels linearer Regression bestimmt und mit dem geometrischen Mittelwert der besten Housekeeping-Gene durch Division normiert werden, so dass das Expressionslevel relativ und dimensionslos ist. Diese Normierung ist zur Korrektur unterschiedlicher Qualität und Ausgangsmengen an Template (cDNA respektive mRNA) notwendig (Jansohn und Rothhämel 2012, S. 162–163).

Als Housekeeping-Gene wurden TATA-box binding protein (*TBP*), large ribosomal protein (*RPLP0*) und Actin beta (*ACTB*) mit der Software NormFinder.xla (Andersen et al. 2004; Stern-Straeter et al. 2009) auf ihre Stabilität hin untersucht. Anschließend wurde noch die relative Quantität der zu untersuchenden Proben bestimmt, indem das Expressionslevel der Gene von Interesse durch das Expressionslevels des Kalibrators (=Kontrollgruppe) dividiert wurde. Diese relative Quantität wird als x-faches des Kalibrators ausgedrückt und ist ebenso dimensionslos.

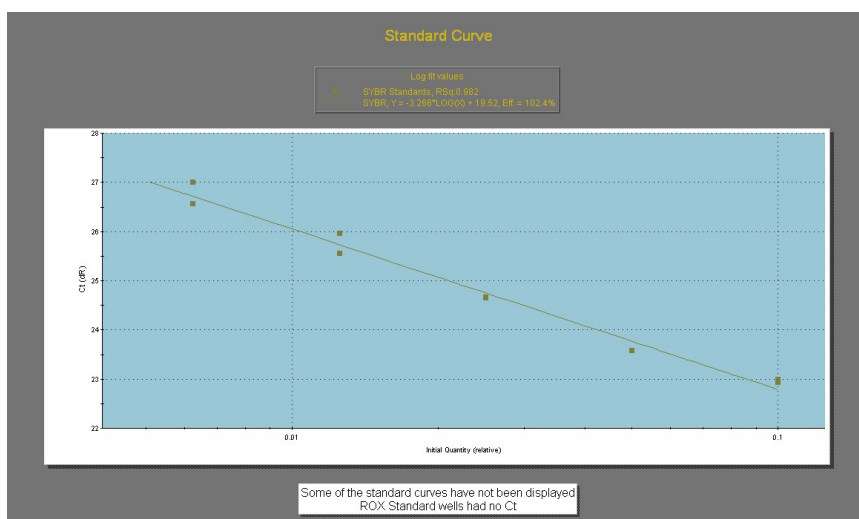
Abb. 8 zeigt am Beispiel des Gens *VEGFB* die Amplifikationskurve, die Dissoziationskurve sowie die Standardkurve.



A



B



C

Abb. 8: Exemplarische VEGFB qRT-PCR aller Gewebeproben.
 A) Amplifikationskurve
 B) Dissoziationskurve
 C) Standardkurve

2.2.8. Protein-Array

2.2.8.1. Proteinextraktion

Die Proteinextraktion erfolgte aus der untersten roten Phenol-Chloroform-Phase der PCR-Vorbereitung. Die Extraktion wurde nach der Anleitung, welche dem peqGOLD TriFast® von Peqlab beiliegt, durchgeführt.

0,3 M Guanidinhydrochlorid in 95% Ethanol ansetzen:

14,33g Guanidinhydrochlorid

25ml Aqua dest.

475ml 100% Ethanol

Extraktionspuffer ansetzen:

100ml PBS

1g Triton

2 Tbl. Protease Inhibitor (EDTA free complete) cocktail

Durchführung:

DNA Präzipitation:

- 1) 300µl 100% Ethanol auf die Phenol-Chloroform Lösung geben, das Ethanol färbt sich rot
- 2) Invertieren
- 3) Bei RT stehen lassen 3 min
- 4) Bei 4°C mit 2000 x g zentrifugieren 15 min
- 5) Jeweils 420µl des Überstand mit enthaltenem Protein in 2 Reaktionsgefäße überführen, DNA Pellets verwerfen

Protein Präzipitation:

- 6) 1,26ml Aceton dazugeben (anschließendes Verhältnis
Aceton:Phenol/Ethanol/Chloroform = 3:1)
- 7) Invertieren
- 8) Bei RT stehen lassen 10 min
- 9) Bei 4°C bei 13000 x g zentrifugieren 30 min

Waschen der Proteine:

- 10) Aceton abpipettieren und verwerfen
- 11) 2ml 0,3M Guanidinhydrochlorid hinzugeben
- 12) Vortexen
- 13) Bei RT stehen lassen 20 min
- 14) Bei 4°C bei 7500 x g zentrifugieren 5 min
- 15) Überstand abpipettieren und verwerfen
- 16) Schritt 11-15 zweimal wiederholen
- 17) 2ml 100% Ethanol hinzufügen
- 18) Vortexen
- 19) Bei RT stehen lassen 20 min
- 20) Bei 4°C bei 7500 x g zentrifugieren 5 min
- 21) Ethanol abpipettieren und verwerfen
- 22) Probe unter dem Abzug trocknen lassen 30 min
- 23) 500µl Extraktionspuffer auf die Proben geben
- 24) Proben bei -20°C lagern

2.2.8.2. Proteinquantifizierung

Um das in den Proben enthaltene Protein zu quantifizieren, wurde statt des Bradford-Tests das Pierce BCA Protein Assay Kit verwendet und nach Angaben des Herstellers vorgegangen. Dieser Test erfolgt ebenfalls kolorimetrisch mit Messung im Spektralphotometer.

Zuvor wurden die Pellets 15 Minuten im Eis-Ultraschallbad behandelt, mit einem Pistill homogenisiert und nochmals in ein Eis-Ultraschallbad gestellt. Anschließend wurden die Proben 10min bei 4°C und 13000 x g zentrifugiert und die gelösten Proteine im Überstand in Eppendorf Reaktionsgefäße überführt. Proben, deren Protein sich schlecht löste, wurden einem weiteren Lösungsversuch mit 100µl Extraktionspuffer unterzogen und die gewonnenen Überstände zu den vorherigen beigefügt.

Da die Probenmenge limitiert war, wurde 10µl jeder Probe verwendet. Das gewählte Verhältnis von Probe zu Arbeitsreagenz war 1:20. Es wurde nach dem in der Anleitung angegebenen Mikroplatten-Verfahren vorgegangen. Bei 562nm wurde mit dem ELISA-Reader von Tecan und der XFluor4 ELISA-Reader Software die Absorption gemessen, eine Standardkurve mit Hilfe von Rinder Serumalbumin als Standard erstellt und an Hand dieser die unbekannte Proteinkonzentration der Proben bestimmt.

Um die benötigte Menge von 200µg Zelllysate für die Proteomanalyse zu erhalten, wurde die Probenmenge in drei Gruppen gepoolt. Die einzelnen Proben wurden je Pool in gleichen Mengen Zelllysate vereinigt, um insgesamt 200µg Zelllysate je Pool zu erhalten:

Der Probenpool Tu+K+ beinhaltete Proben mit >10% Gewichtsverlust in den letzten 6 Monaten vor der Operation (n=4). Es wurde eine weitere Gruppe mit Proben von Patienten mit Pankreaskarzinom mit 5-10% Gewichtsverlust in 6 Monaten (Tu+K-/++; n=5), sowie eine Gruppe mit 0% Gewichtsverlust (Tu+K-; n=7) erstellt (S. 42, Tab. 2). Die ursprüngliche Tu+K- Gruppe mit Patienten unter 10% Gewichtsverlust innerhalb von 6 Monaten wurde also untergliedert.

Mit Triton wurde das Pool-Zelllysate jeweils auf 2ml aufgefüllt. Anschließend wurde nochmal mit dem ELISA-Reader die Proteinmenge der Probenpools überprüft und falls nötig die Konzentration korrigiert.

2.2.8.3. Proteom Profiler™ Human XL Cytokin Array

Um relative Unterschiede der Quantität von Zytokinen im Skelettmuskelgewebe zu detektieren, wurde das Proteom Profiler™ Human XL Cytokin Array Kit verwendet und nach der beiliegenden Anleitung verfahren. Das Kit enthält Nitrozellulose Membranen

mit jeweils zwei vertikal nebeneinander aufgebrauchten Capture- bzw. Kontrollantikörpern gegen 102 lösliche menschliche Proteine. Aus methodischen Gründen kann für eine Membran nur jeweils ein Probenpool eingesetzt werden. Ähnlich dem Färbeprinzip der CD31 Färbung (S. 48) werden nach gleichzeitiger Inkubation der 3 Membranen mit jeweils einem Probenpool, biotinmarkierte Sekundärantikörper aufgetragen. Mit Streptavidin-Meerrettichperoxidase und Luminol-Chemolumineszenz als Detektorensystem wird ein Signal erzeugt, dass der jeweils gebundenen Proteinmenge proportional ist. Das Fluoreszenz-Signal der 3 Membranen wurde mit einer hochempfindlichen Analysekamera in einer Dunkelkammer und der Software „Fusion Advance-Capt V16.02“ auf einem Foto mit einer Belichtungszeit von 10 Minuten aufgenommen.

2.2.8.4. Auswertung

Die Auswertung dieses Fotos erfolgte mit Image J (Abb. 9). Dafür wurde ein Rechteck, das über die auf der Membran übereinanderliegenden gleichen Analyten passt, als Vorlage definiert. Dieses wurde auf alle Analyten projiziert und durchnummeriert (Abb. 9). Anschließend wurde von den 3 Membranen, entsprechend den oben definierten Gruppen, die relative Veränderung der Pixeldichte der jeweiligen Analyten bestimmt. Hierfür diente beim Protein-Array Tu+K- mit 0% Gewichtsverlust als Kontrolle und die zwei anderen Probenpools wurden hierzu in Relation gesetzt. Als Negativkontrolle wurde J23/24 verwendet, zwei Punkte auf der Membran auf denen PBS statt Antikörper aufgebracht ist. Die durchschnittliche Pixeldichte der Negativkontrolle wurde jeweils von der gemessenen Pixeldichte der anderen Analyten abgezogen. Dies war nötig, um eine unterschiedliche Ausleuchtung in der Fotobox sowie methodisch bedingte Hintergrundstrahlung auszugleichen. Als Positivkontrolle dienten die im Kit angegebenen Referenzpunkte (A1/2; A23/24; J1/2)

.

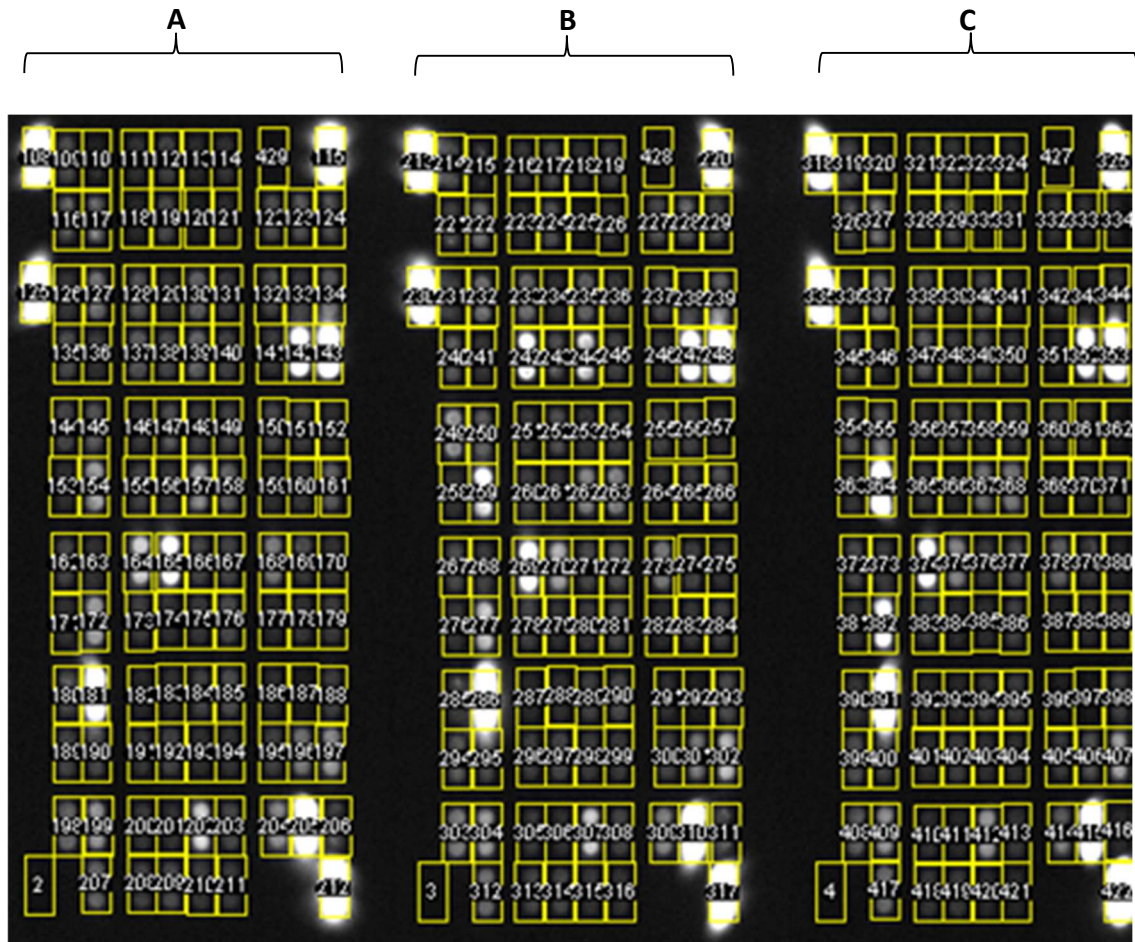


Abb. 9: Proteom Profiler Auswertung. Von links nach rechts 3 Array-Membranen mit folgenden Probenpools:

A: Tu+K+ (>10%) B: Tu+K+/- (5-10%) C: Tu+K- (0%).

In Klammern Gewichtsverlust in %.

2.2.9. Statistische Auswertung der Patientendaten und Messergebnisse

Die Daten wurden mit Microsoft Excel 2010 analysiert und graphisch dargestellt.

Patientenalter, Gewicht, Größe, BMI und der Gewichtsverlust in den letzten 6 Monaten vor der Operation können auf einer Verhältnisskala abgebildet werden. Somit konnte der Lageunterschiede der Daten beider Gruppen, wie weiter unten beschrieben, berechnet werden.

Geschlecht, Diabetes, Rauchen, Alkoholkonsum, UICC-Level, Einnahme von Medikamenten haben in ihren Ausprägungen keine natürliche Rangfolge und können nur Kategorien zugeordnet werden. Somit sind diese Daten nominalskaliert und der

statistische Lageunterschied wurde mit dem Qi-Quadrat-Test bestimmt. Diese Daten wurden als Modalwert, dem am häufigsten vorkommenden Wert, angegeben.

Die Messergebnisse wurden zunächst mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung getestet. Wenn eine Normalverteilung vorlag, wurde ein F-Test für die Varianzanalyse durchgeführt, um einen parametrischen t-Test auf Lageunterschied anwenden zu können. Wenn die Daten nicht normalverteilt oder die mit dem t-Test untersuchten Unterschiede nicht signifikant waren, wurde der nichtparametrische Wilcoxon-Mann-Whitney-Test (U-Test) benutzt.

Die histochemischen Ergebnisse beruhen zum größten Teil auf kleinen Gruppengrößen mit weniger als 10 Proben, daher sind diese Ergebnisse als Streudiagramme mit einer Markierung des arithmetischen Mittelwerts (\bar{x}) dargestellt. Bei dieser kleinen Probenanzahl wurde auf eine Definition von Extremwerten oder Ausreißern verzichtet.

Die ASA und die PCR wurden mit einer größeren Probenanzahl, im Durchschnitt $N > 10$, durchgeführt. Daher konnten deren Ergebnisse in Box-Whisker-Plots dargestellt werden, in denen die Boxen durch das erste und dritte Quartil begrenzt und unterteilt durch den Median (ME) sind. Die Differenz zwischen dem dritten und ersten Quartil ist der Interquartilsabstand (IQR). Als obere und untere „Ausreißer-Grenze“ wurde ($ME \pm 1,5 \cdot IQR$) definiert. Die Antennen des Box-Plots, auch Whisker genannt, markieren den kleinsten und größten Wert, die noch innerhalb dieser Grenzen liegen. Werte außerhalb der Ausreißergrenzen wurden nicht weiter in die Berechnungen einbezogen und deren Lage als kleine Kreise im Diagramm kenntlich gemacht. Mit einer waagerechten Linie wurde das arithmetische Mittel dargestellt.

Vermutete Zusammenhänge von untersuchten Merkmalen wurden einer Prüfung mittels Korrelationsanalyse nach Pearson unterzogen. Inwieweit die Daten in einem linearen Zusammenhang stehen wurde anhand des Korrelationskoeffizienten „r“ und dem Signifikanzniveau angegeben. Die Stärke des ermittelten Zusammenhangs zweier Merkmale wird durch eine zwischen -1 und 1 liegende Maßzahl angegeben. Je größer der absolute Betrag des Koeffizienten ist, desto stärker ist der Zusammenhang. Das Vorzeichen des Korrelationskoeffizienten bestimmt die Richtung des linearen Zusammenhangs. Das Quadrat des Korrelationskoeffizienten (r^2), auch

Bestimmtheitsmaß „B“ genannt, lässt sich interpretieren als prozentualer Anteil der Streuung der abhängigen Variable, die durch die unabhängige Variable erklärt werden kann (und umgekehrt).

Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als signifikant gewertet.

3. ERGEBNISSE

Grundlage der Untersuchungen sind die Gewebeproben des M. rect. abd. von Patienten mit Pankreaskarzinom mit (Tu+K+; >10% Gewichtsverlust in 6 Monaten) oder ohne Gewichtsverlust (Tu+K-; <10% Gewichtsverlust in 6 Monaten).

3.1. Patientendaten

Wie Tab. 5 zu entnehmen ist, unterschieden sich die beiden zu vergleichenden Gruppen (Tu+K- vs. Tu+K+), deren Muskelproben analysiert wurden, nicht signifikant bezüglich Geschlecht, Alter, Operationsgewicht, Größe, BMI, Stadium der Tumorerkrankung (UICC) oder Medikamenteneinnahme, insbesondere von Glukokortikoiden oder COX2-Hemmern. Bezüglich des Nikotin- und Alkoholkonsums zeigten sich auch keine signifikanten Unterschiede zwischen den zwei Gruppen.

Aufgrund der Einschlusskriterien zeigte die Gruppe der kachektischen Patienten (Tu+K+) einen signifikant höheren Gewichtsverlust als die Patienten der nicht kachektischen Kontrollgruppe (Tu+K-) ($p < 0,001$). Darüber hinaus war bei den kachektischen Patienten signifikant häufiger ein Diabetes mellitus Typ II diagnostiziert worden ($p < 0,001$).

Tab. 5: Anthropometrische Daten, UICC-Stadien, Alkohol-, Nikotinkonsum und Medikamenteneinnahme.
 Modalwert bzw. arithmetisches Mittel \pm SEM. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.
 NA= nicht angegeben.

	Tu+K-	Tu+K+	p-Wert (Tu+K+/Tu+K-)
N_{ges.} (weiblich/männlich)	22 (10/12)	14 (6/8)	0,879
Alter bei OP (Jahre)	64,2 \pm 2,5	68,2 \pm 3,0	0,171
Gewicht bei OP (kg)	70,3 \pm 2,2	67,3 \pm 2,4	0,111
Größe (cm)	170,0 \pm 2,5	168,7 \pm 2,9	0,377
BMI (kg/m²)	24,3 \pm 0,9	23,4 \pm 1,0	0,245
Gewichtsverlust (%)	2,8 \pm 0,6	15,5 \pm 0,8	0,000***
UICC (I-IIA/IIB/III-IV)	5/8/9	2/7/5	0,686
Diabetes mellitus Typ II (ja/nein)	2/20	9/5	0,001***
Regelmäßiger Alkoholkonsum (ja/gelegentlich/nein/NA)	2/8/7/5	0/3/6/5	0,353
Raucher (ja/nein/NA)	1/16/5	2/7/5	0,215
COX2-Hemmer (ja/nein)	1/21	0/14	0,419
Glukokortikoide (ja/nein)	0/22	0/14	1,000

3.2. (Immun-) Histochemie

3.2.1. Fasergröße

Die durchschnittliche Muskelfasergröße wurde im Muskelquerschnitt gemessen. Die mittlere Muskelfaserfläche zeigte für die gesamte Faserpopulation (d.h. Fasertyp I, IIa und IIx) bei Tu+K+ ($3297\mu\text{m}^2$) gegenüber Tu+K- ($2574\mu\text{m}^2$) keinen signifikanten Unterschied ($p=0,123$; Abb. 10A; Tab. 9 im Anhang). Dabei erwies sich die mittlere Faserfläche des Fasertyps I in Tu+K+ tendenziell um 56% größer als in Tu+K- (Tu+K+: $2991\mu\text{m}^2$; Tu+K-: $1920\mu\text{m}^2$; $p=0,097$; Abb. 10B). Die Muskelfasergröße des Fasertyps IIa unterschied sich nicht signifikant zwischen den beiden Gruppen (Tu+K+: $3848\mu\text{m}^2$; Tu+K-: $3165\mu\text{m}^2$; $p=0,319$; Abb. 10C). Dies galt auch für Fasertyp IIx (Tu+K+: $2452\mu\text{m}^2$; Tu+K-: $3232\mu\text{m}^2$; $p=0,261$; Abb. 10D). Bei Kachexiepatienten zeigte der Fasertyp IIa die größte mittlere Faserfläche im Vergleich zu den beiden anderen Fasertypen. In der Kontrollgruppe waren die Fasern des Fasertyp IIx am größten.

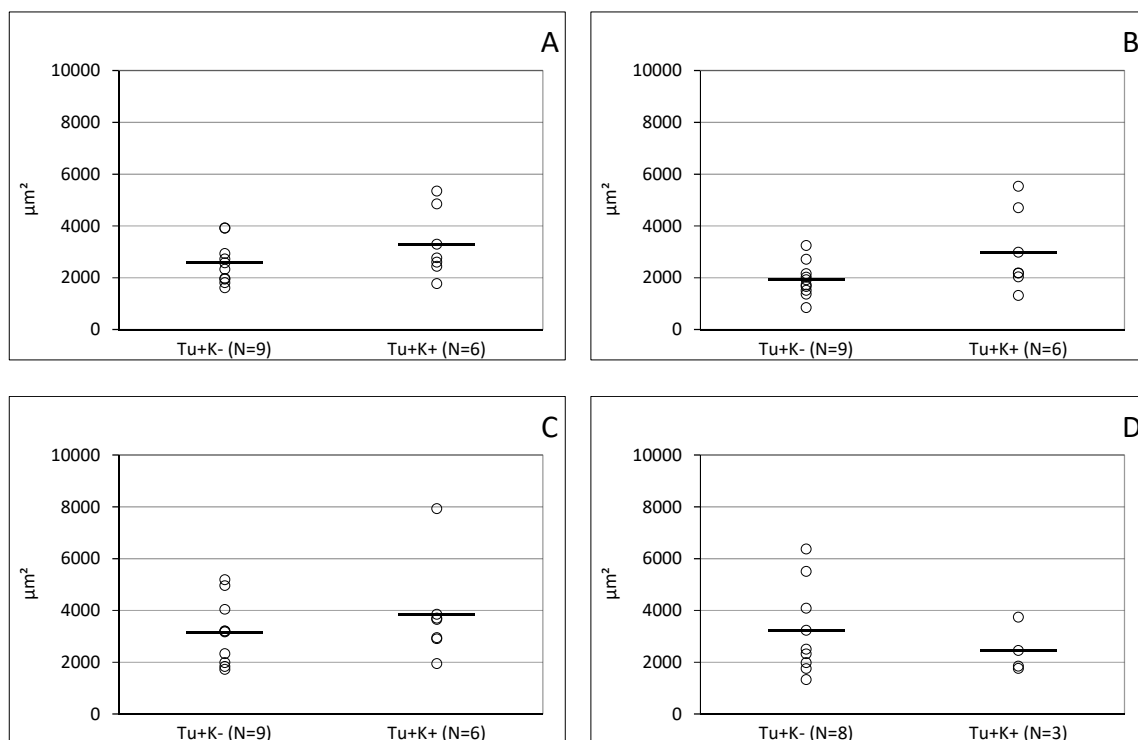


Abb. 10: Mittlere Muskelfaserfläche [μm^2].

A) Alle Fasern B) Fasertyp I

C) Fasertyp IIa

D) Fasertyp IIx

— arithmetischer Mittelwert

3.2.2. Faserdichte

Es bestand keine signifikanter Unterschied zwischen Tu+K+ und Tu+K- bezüglich der Faserdichte aller Fasertypen gemeinsam, berechnet als Anzahl der Muskelfasern (im Querschnitt) pro 1mm^2 ausgewertete Gesamtfläche (Tu+K+: $268,92/\text{mm}^2$; Tu+K-: $329,68/\text{mm}^2$; $p=0,161$; Abb. 11A; Tab. 10 im Anhang). Auch die Faserdichte der einzelnen Fasertypen zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den kachektischen Patienten und den Patienten ohne Gewichtsverlust (I: Tu+K+: $113,87/\text{mm}^2$; Tu+K-: $146,96/\text{mm}^2$; $p=0,148$; IIa: Tu+K+: $128,97/\text{mm}^2$; Tu+K-: $130,26/\text{mm}^2$; $p=0,488$; IIx: Tu+K+: $27,12/\text{mm}^2$; Tu+K-: $52,46/\text{mm}^2$; $p=0,143$; Abb. 11B, C, D). Die höchsten Faserdichte hatte der Fasertyp I bei Tu+K-.

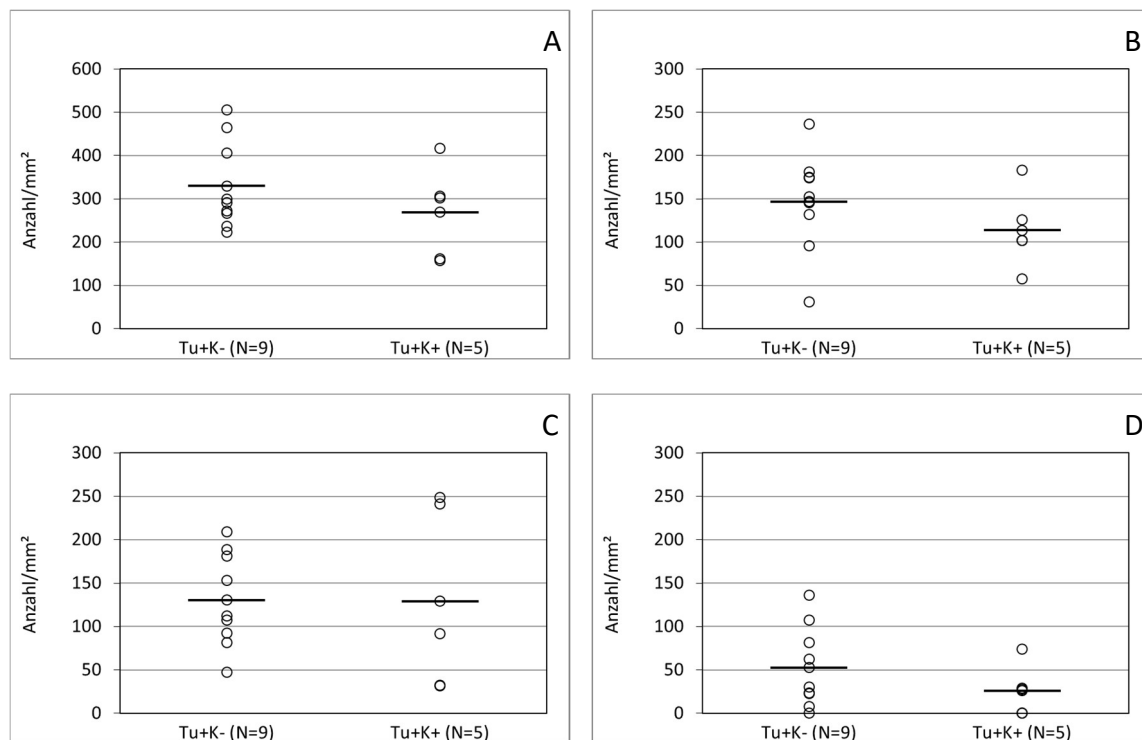


Abb. 11: Faserdichte [Anzahl Fasern/ mm^2 Gesamtfläche].

A) Alle Fasern B) Fasertyp I C) Fasertyp IIa D) Fasertyp IIx
 — arithmetischer Mittelwert

3.2.3. Faserkomposition

Die Faserkomposition ist der Anteil jeder der 3 identifizierten Fasertypen an der Gesamtanzahl aller Fasern, angegeben in %.

In den zwei untersuchten Gruppen lagen die Fasertypen I, IIa und IIx mosaikartig verteilt und ohne lokale Häufung vor. Weder der prozentuale Anteil der Muskelfasern des Fasertyps I, noch der von Fasertyp IIa oder IIx unterscheiden sich signifikant zwischen den Tu+K+ und Tu+K- Patientengruppen (I: Tu+K+: 50%; Tu+K-: 46%; $p=0,355$; IIa: Tu+K+: 42%; Tu+K-: 39%; $p=0,376$; IIx: Tu+K+: 7%; Tu+K-: 15%; $p=0,419$; Abb. 12A, B, C).

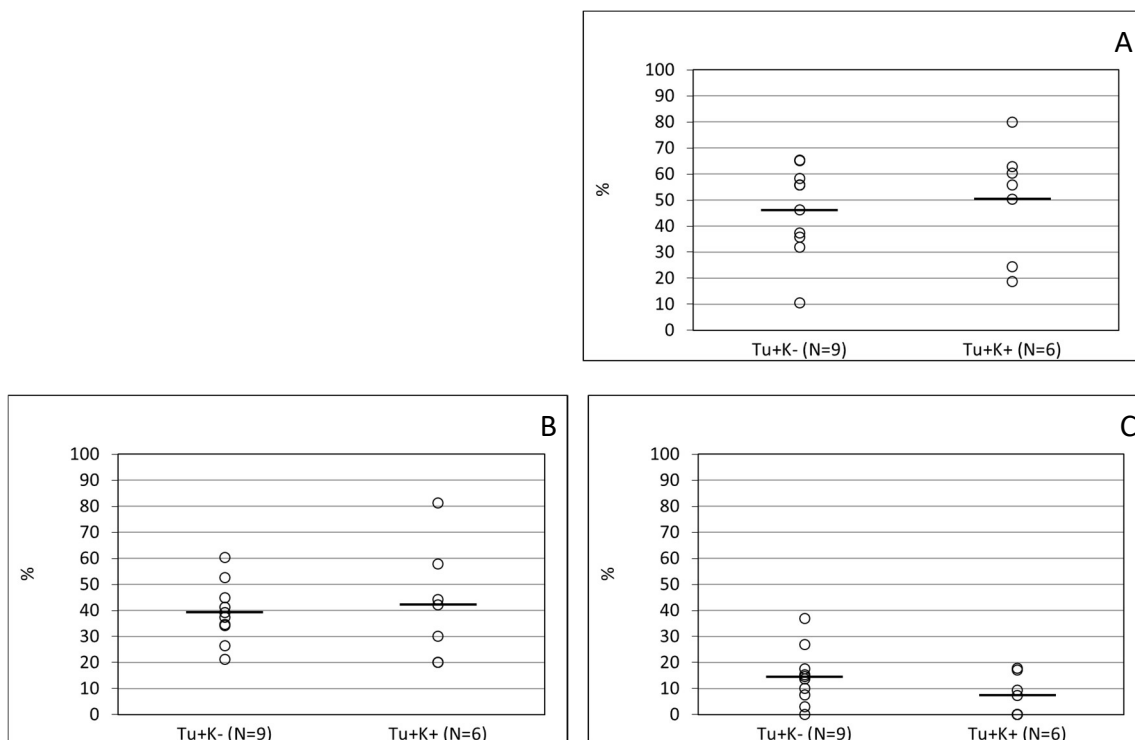


Abb. 12: Faserkomposition [%].

A) Fasertyp I B) Fasertyp IIa C) Fasertyp IIx
 — arithmetischer Mittelwert

3.2.4. Anteil der Muskelfaserfläche an der Gesamtfläche

Der prozentuale Anteil der Gesamtfaserfläche (Summe der Faserflächen aller Muskelfasertypen) an ausgewerteter Gesamtfläche (Muskelfasern + Bindegewebe + Kapillaren) war im Vergleich zwischen Tu+K+ (80%) und Tu+K- (79%) nicht signifikant unterschiedlich ($p=0,396$; Abb. 13A; Tab. 12 im Anhang). Dabei zeigte der prozentuale Anteil der Gesamtfläche von Fasertypen I und IIa keinen Unterschied zwischen Tu+K+ und Tu+K- (I: Tu+K+: 36%; Tu+K-: 29%; $p=0,218$; IIa: Tu+K+: 38%; Tu+K-: 36%; $p=0,416$; Abb. 13B; Abb. 13C). Allerdings fand sich eine tendenziell um 8% geringere Faserfläche des Fasertyps IIx pro μm^2 Gesamtfläche bei Tu+K+ gegenüber Tu+K- (Tu+K+: 6%; Tu+K-: 14%; $p=0,055$; Abb. 13D). Diese beobachtete Tendenz eines um 50% kleineren Gesamtflächenanteils von Fasertyp IIx stimmt mit der geringeren Fasergröße (Abb. 10D), als auch tendenziell verringerten Faseranteil von Fasertyp IIx (Abb. 12C) überein. Fasertyp IIa hatte mit 38% bei Tu+K+ den größten Anteil an der Gesamtfläche.

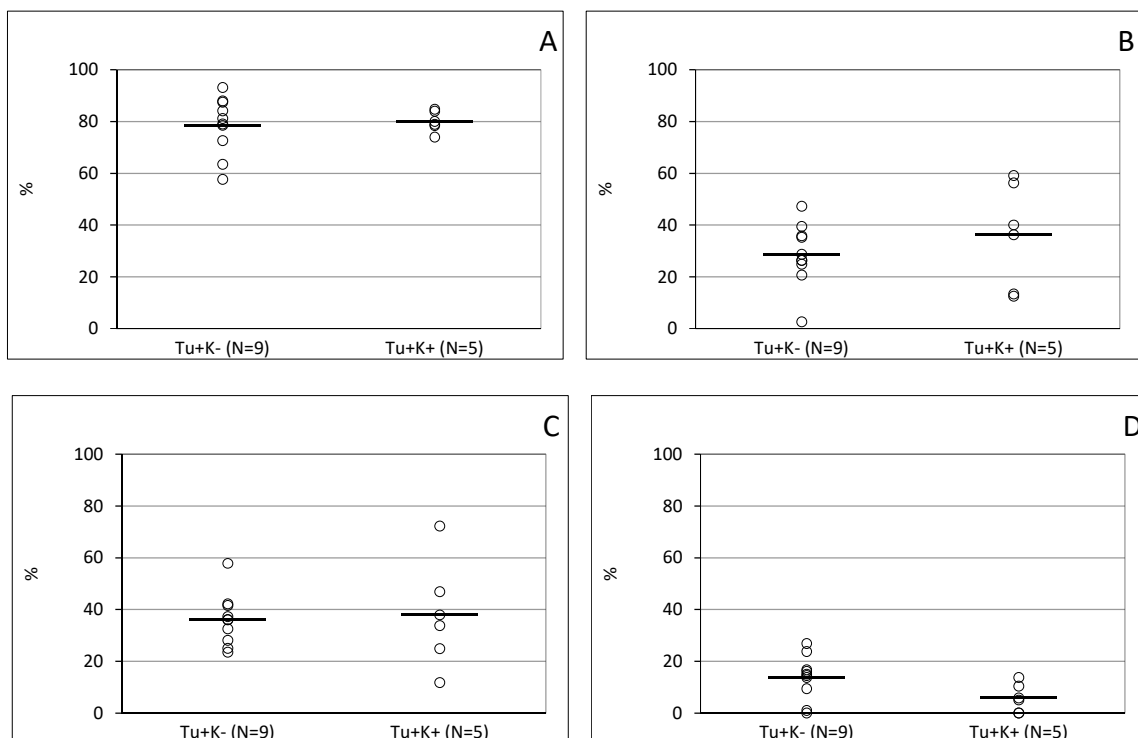


Abb. 13: Anteil der Muskelfaserfläche an der Gesamtfläche.

A) Alle Fasern B) Fasertyp I C) Fasertyp IIa D) Fasertyp IIx
 — arithmetischer Mittelwert

3.2.5. Kapillarkontakte

Alle Fasern gemeinsam betrachtet (I, IIa, IIx), wies Tu+K+ mit durchschnittlich 2,3 Kapillarkontakten pro Muskelfaser tendenziell 33% mehr Kapillarkontakte pro Muskelfaser auf als Tu+K- mit 1,7 Kapillarkontakten ($p=0,097$; Abb. 14A; Tab. 13 im Anhang). Die Anzahl der Kapillarkontakte korrelierten positiv und signifikant mit der mittleren Muskelfasergröße ($r=0,821$; $p<0,001$; Abb. 15). Nicht signifikant korrelierten die Kapillarkontakte mit dem Gewichtsverlust ($r=0,447$; $p=0,095$), *CD68* ($r=-0,234$; $p=0,489$), *Trim63* ($r=0,579$; $p=0,102$) bzw. *FBXO32* ($r=-0,042$; $p=0,909$) (Tab. 22 im Anhang).

Die Anzahl der Kapillarkontakte des Fasertyps I war tendenziell um 39% in Tu+K+ mit 2,4 Kontakten im Vergleich zu 1,8 Kontakten in Tu+K- höher ($p=0,075$; Abb. 14B). Die Anzahl der Kapillarkontakte des Fasertyps IIa und IIx war zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant unterschiedlich (IIa: Tu+K+: 2,0; Tu+K-: 1,8; $p=0,395$; IIx: Tu+K+: 1,4; Tu+K-: 1,7; $p=0,353$; Abb. 14C; D).

Die meisten Kapillarkontakte pro Muskelfaser (2,4) lagen in Tu+K+ bei Fasertyp I vor.

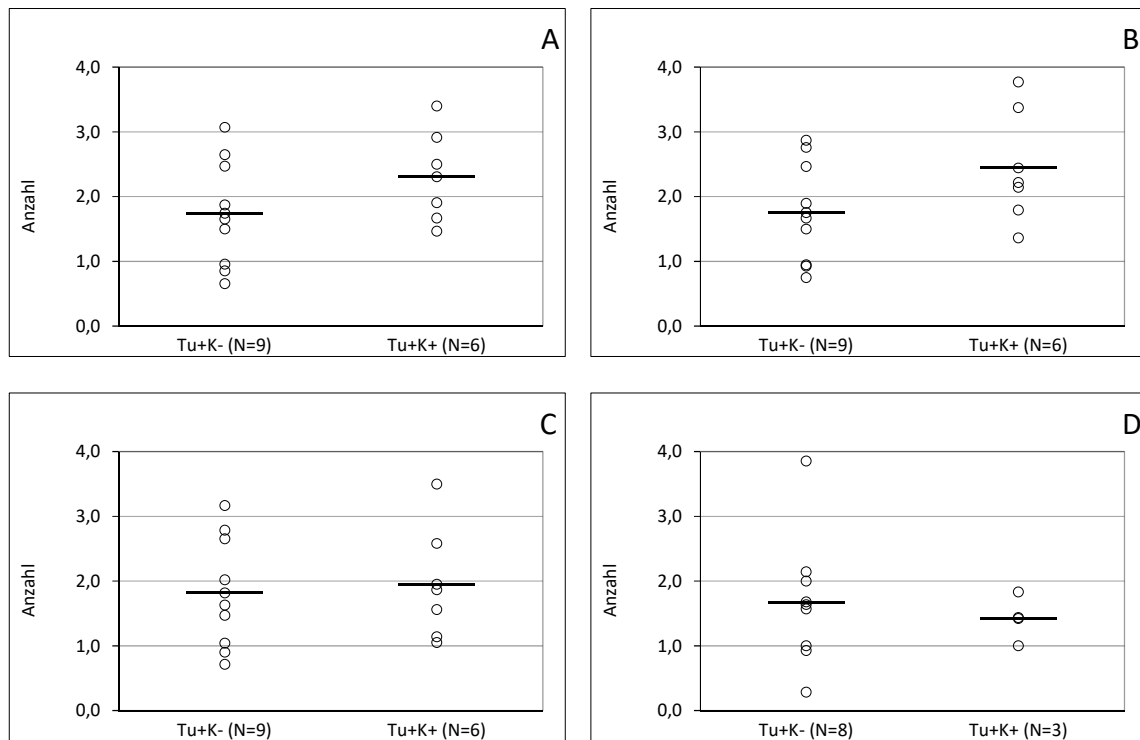


Abb. 14: Mittlere Anzahl Kapillarkontakte.

A) Alle Fasern B) Fasertyp I

C) Fasertyp IIa

D) Fasertyp IIx

— arithmetischer Mittelwert

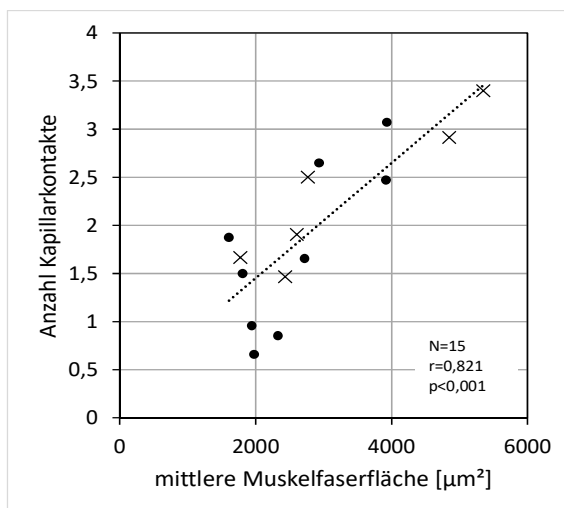


Abb. 15: Korrelation der mittleren Anzahl Kapillarkontakte mit der mittleren Fasergröße [μm²].

•=Tu+K-; x=Tu+K+

3.2.6. Kapillardichte

Mit Kapillardichte wird die Anzahl Kapillaren pro ausgewertete Gesamtfläche oder pro ausgewertete Faserfläche bezeichnet.

Bezogen auf die Gesamtfläche unterscheidet sich die Kapillardichte nicht signifikant zwischen Tu+K+ und Tu+K- (Tu+K+: 373,85/mm²; Tu+K-: 350,55/mm²; p=0,379; Abb. 16A).

Ebenso gibt es bzgl. der Kapillardichte bezogen auf die Faserfläche keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen (Tu+K+: 448,07/mm²; Tu+K-: 445,32/mm²; p=0,487; Abb. 16B).

Auch das Verhältnis der Anzahl Kapillaren pro Muskelfaser zeigt bei Tu+K+ im Vergleich zu Tu+K- keinen signifikanten Unterschied (Tu+K+: 1,29; Tu+K-: 1,11; p=0,22; Abb. 16C).

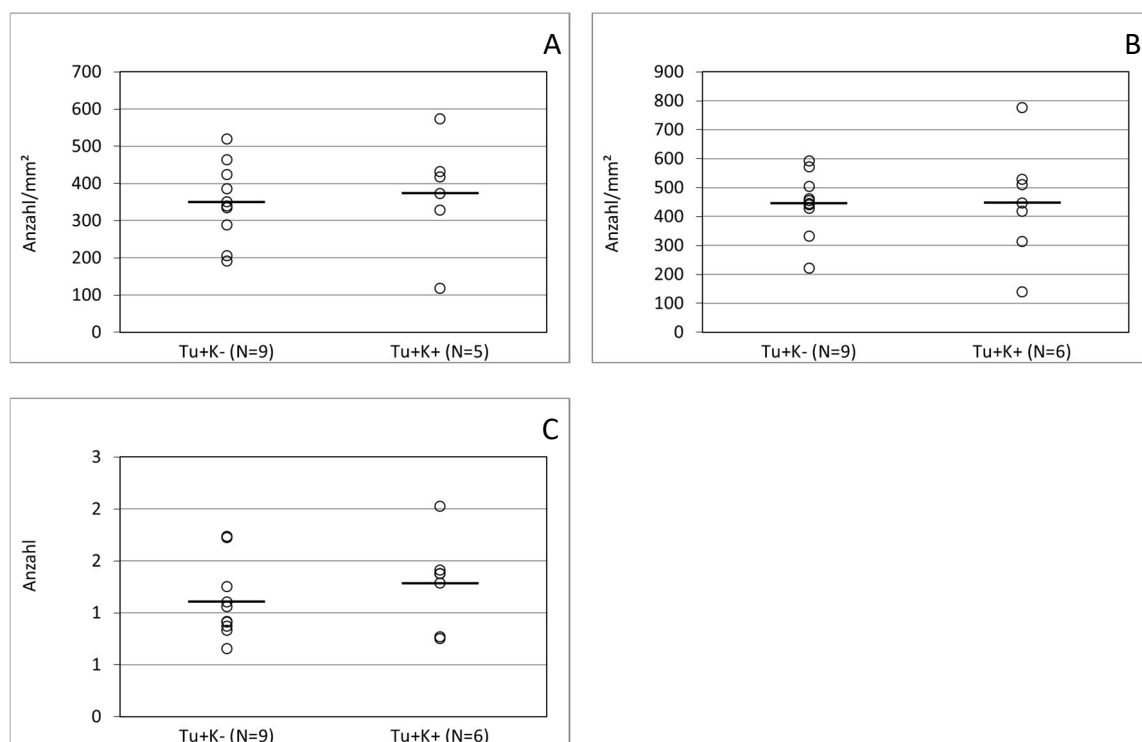


Abb. 16: Kapillardichte [Anzahl/mm²].

A) Anzahl Kapillaren pro 1mm² Gesamtfläche

B) Anzahl Kapillaren pro 1mm² Faserfläche

C) Anzahl Kapillaren pro Muskelfaser

— arithmetischer Mittelwert

3.2.7. Faserfläche pro Kapillarkontakt

Eine Kapillare mit Faserkontakt versorgte in Tu+K+ durchschnittlich $1407\mu\text{m}^2$ Faserfläche und in Tu+K- eine Faserfläche von $1717\mu\text{m}^2$ (jeweils inkl. Fasertyp I, IIa, IIx) ($p=0,138$; Abb. 17A; Tab. 15 im Anhang).

Auch in einzelnen Fasertypen unterschieden sich Tu+K+ und Tu+K- bzgl. der von einer Kapillare versorgten Faserfläche nicht signifikant (I: Tu+K+: $1160\mu\text{m}^2$; Tu+K-: $1195\mu\text{m}^2$; $p=0,425$; IIa: Tu+K+: $2133\mu\text{m}^2$; Tu+K-: $2010\mu\text{m}^2$; $p=0,409$; IIx: Tu+K+: $1697\mu\text{m}^2$; Tu+K-: $2656\mu\text{m}^2$; $p=0,419$; Abb. 17B, C, D).

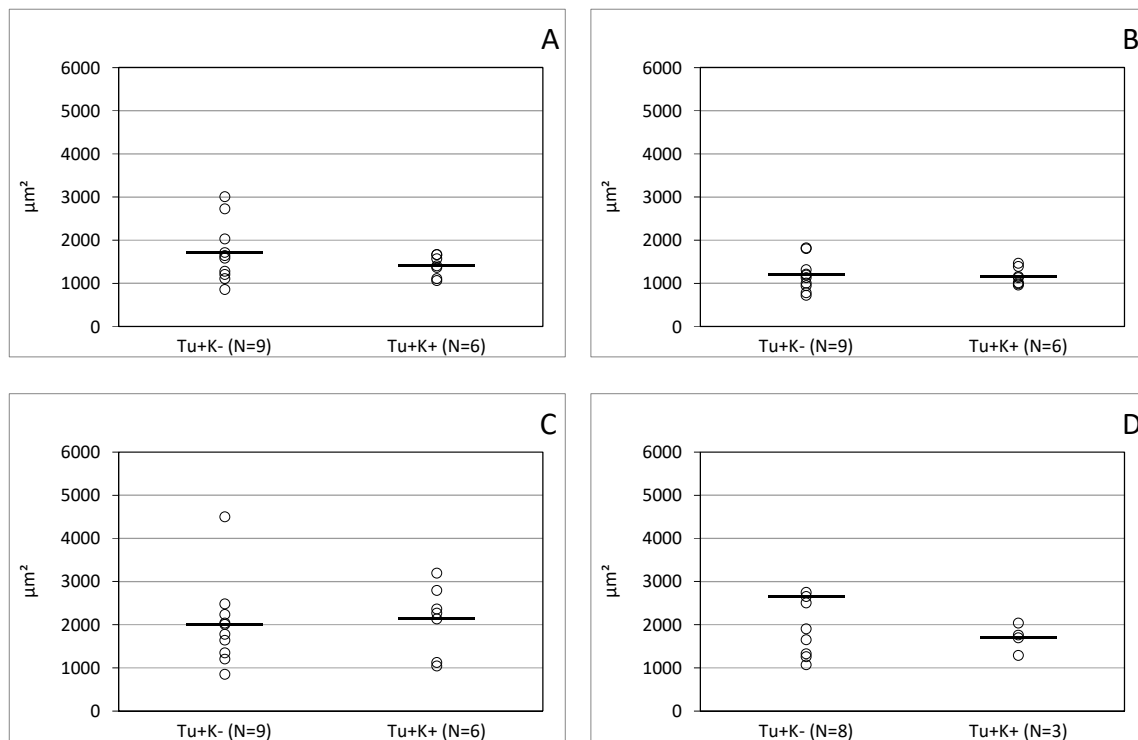


Abb. 17: Faserfläche pro Kapillarkontakt [μm^2].

A) Alle Fasern B) Fasertyp I C) Fasertyp IIa D) Fasertyp IIx
 — arithmetischer Mittelwert

3.2.8. Zentralisierte Zellkerne

In Tu+K+ hatten 18% aller Muskelfasern (I, IIa, IIx) zentralisierte Zellkerne, während dies bei Tu+K- bei 13% der Muskelfasern der Fall war ($p=0,085$; Abb. 18A und Tab. 16 im Anhang). Der größte Anteil Muskelfasern mit zentralisierten Zellkernen war jeweils vom Fasertyp IIa. Dies ergab sich sowohl für den prozentualen Anteil innerhalb aller Muskelfasern mit zentralisierten Zellkernen (IIa: Tu+K+: 57%; Tu+K-: 57%; $p=0,477$; Tab. 18 im Anhang), als auch für den prozentualen Anteil an allen ausgewerteten Muskelfasern (IIa: Tu+K+: 9,11%; Tu+K-: 7,34%; $p=0,196$; Tab. 17 im Anhang), wobei sich Tu+K+ und Tu+K- nicht signifikant unterschieden.

Innerhalb des Fasertyps I war der prozentuale Anteil der Fasern mit zentralisierten Zellkernen signifikant um 7% in Tu+K+ gegenüber Tu+K- erhöht (Tu+K+: 12%; Tu+K-: 5%; $p=0,031$; Abb. 18B). Für den Fasertyp IIa zeigte sich kein signifikanter Unterschied (Tu+K+: 25%; Tu+K-: 19%; $p=0,257$; Abb. 18C). Bezogen auf den Fasertyp IIx zeigte sich die Tendenz, dass der prozentuale Anteil in Tu+K+ um 4% gegenüber Tu+K- erhöht war (Tu+K+: 23%; Tu+K-: 19%; $p=0,067$; Abb. 18D).

Der prozentuale Anteil der Muskelfasern mit zentralisierten Zellkernen an allen Muskelfasern korrelierte signifikant positiv mit dem Gewichtsverlust ($r=0,527$; $p=0,043$; Abb. 19). Es bestand kein signifikanter Zusammenhang zwischen diesem prozentualen Anteil und der mittleren Muskelfasergröße ($r=0,110$; $p=0,696$), der Anzahl der Kapillarkontakte ($r=0,147$; $p=0,602$) oder der Genexpression von *CD68* ($r=-0,191$; $p=0,573$) (Tab. 22 im Anhang).

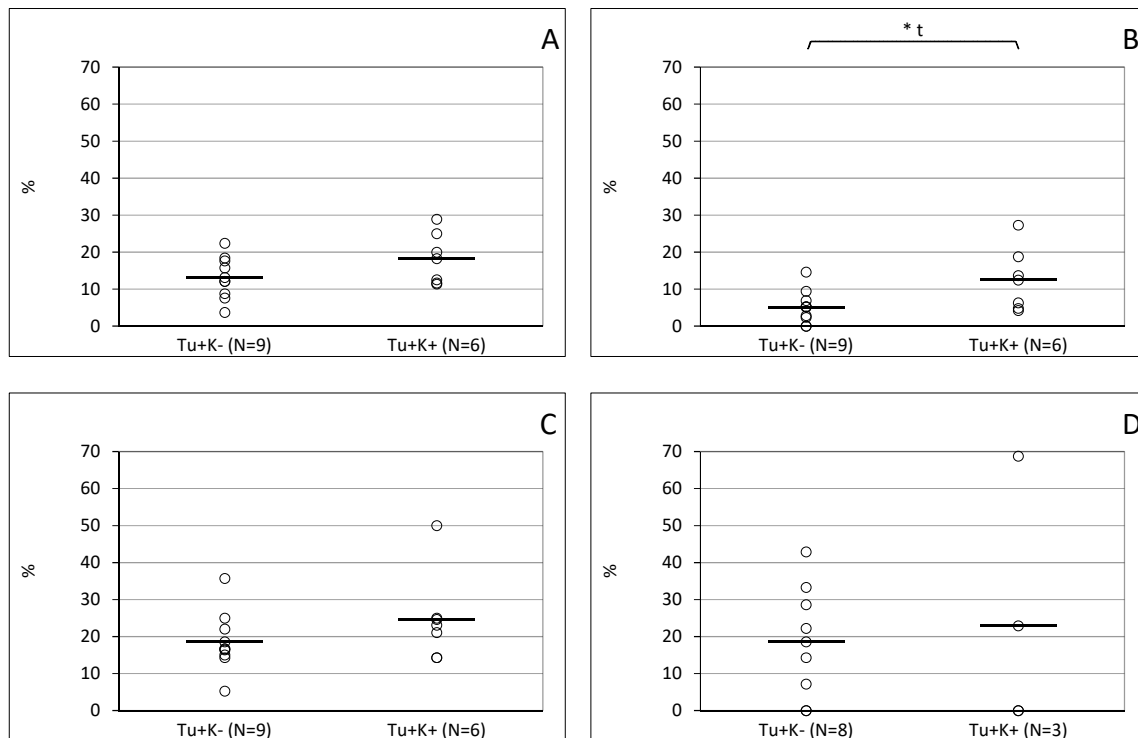


Abb. 18: Prozentuale Anteil der Fasern mit zentralisierten Zellkernen an allen Fasern, von Fasertyp I, IIa oder IIx [%].

A) Alle Fasern B) Fasertyp I C) Fasertyp IIa D) Fasertyp IIx

— arithmetischer Mittelwert

t=T-Test; U= U-Test; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

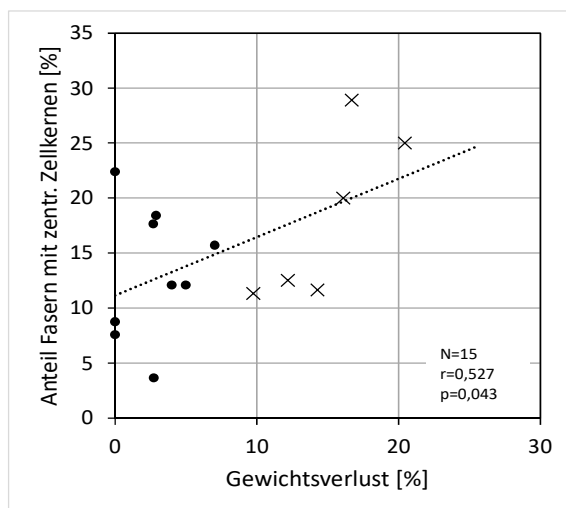


Abb. 19: Korrelation zwischen Gewichtsverlust [%] und dem prozentualen Anteil aller Fasern mit zentralisierten Zellkernen an Gesamtzahl der Fasern [%].

•=Tu+K-; x=Tu+K+

3.3. Aminosäureanalyse

Die intrazellulären Konzentrationen der mittels HPLC gemessenen Aminosäuren im Skelettmuskel wurden als Aminosäurekonzentration in nmol pro mg Protein bestimmt. Es wurden 32 Proben des M. rect abd. untersucht (Tu+K+: N=19; Tu+K-: N=13).

3.3.1. Essentielle Aminosäuren

Die intrazelluläre Konzentration der Aminosäure Leucin war in Tu+K+ gegenüber Tu+K- signifikant um 20% niedriger (Tu+K+: 2,04nmol/mg; Tu+K-: 2,56nmol/mg; $p=0,022$; Abb. 20 A).

Darüber hinaus korrelierte die Konzentration von Leucin signifikant negativ mit dem Gewichtsverlust ($r=-0,374$; $p=0,046$; Abb. 21A) und korrelierte signifikant positiv mit der Genexpression von *TRIM63* ($r=0,682$; $p=0,005$; Abb. 21B). Keine Korrelation fand sich zwischen Leucin und *FBXO32* ($r=0,177$; $p=0,511$), der Fasergröße ($r=0,106$; $p=0,718$) bzw. *CD68* ($r=-0,109$; $p=0,677$) (Tab. 22 im Anhang).

Isoleucin, die essentielle Aminosäure mit der geringsten nachweisbaren Konzentration, war dabei in Tu+K+ tendenziell um 2% geringer als in Tu+K- (Tu+K+: 0,93nmol/mg; Tu+K-: 0,95nmol/mg; $p=0,099$; Tab. 19 im Anhang).

Die Threoninkonzentration war in Tu+K+ sehr signifikant um 22% geringer als in Tu+K- (Tu+K+: 4,38nmol/mg; Tu+K-: 5,58nmol/mg; $p=0,003$; Abb. 20B).

Für Histidin fand sich in Tu+K+ eine um 19% signifikant höhere Konzentration als in Tu+K- (Tu+K+: 3,47nmol/mg; Tu+K-: 2,91nmol/mg; $p=0,034$; Abb. 20 C).

Die intrazelluläre Konzentration von Lysin war im Skelettmuskel in Tu+K+ tendenziell um 19% höher als in Tu+K- (Tu+K+: 10,35nmol/mg; Tu+K-: 8,69nmol/mg; $p=0,076$; Tab. 19 im Anhang).

Valin (Tu+K+: 2,07nmol/mg; Tu+K-: 2,35nmol/mg; $p=0,445$) und Methionin (Tu+K+: 0,22nmol/mg; Tu+K-: 0,29nmol/mg; $p=0,157$) zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (Tab. 19 im Anhang).

Tryptophan und Phenylalanin konnten intrazellulär nicht nachgewiesen werden.

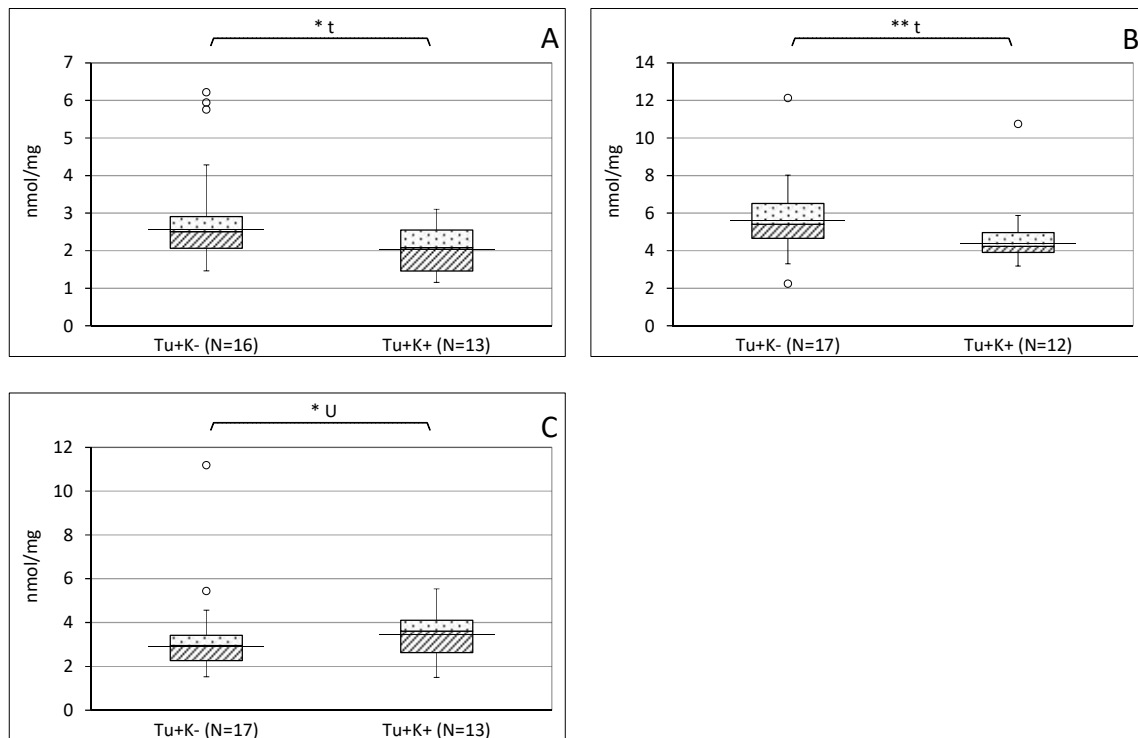


Abb. 20: Intrazelluläre Aminosäurekonzentration [nmol/mg] von (A) Leucin, (B) Threonin und (C) Histidin.

— arithmetischer Mittelwert. ○ Ausreißer

t=T-Test; U=U-Test; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

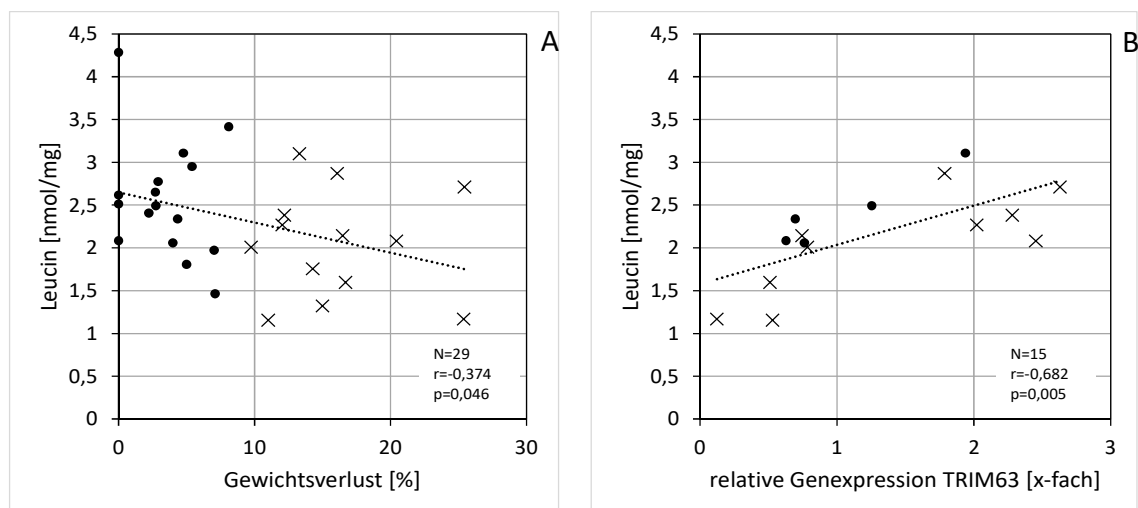


Abb. 21: Korrelationen von (A) Leucin mit Gewichtsverlust [%] und (B) Leucin mit rel. Genexpression von *TRIM63* [x-fach].

●=Tu+K-; x=Tu+K+

3.3.2. Nicht essentielle Aminosäuren

Die Konzentration der nicht essentiellen Aminosäure Aspartat war in Tu+K+ um 43% signifikant höher als in Tu+K- (Tu+K+: 9,41nmol/mg; Tu+K-: 6,56nmol/mg; $p=0,015$; Abb. 22A).

Die Glycinkonzentration war in Tu+K+ signifikant um 14% geringer als in Tu+K- (Tu+K+: 10,19nmol/mg; Tu+K-: 11,86nmol/mg; $p=0,045$; Abb. 22B).

Glutamin erwies sich im Skelettmuskel mit 75nmol/mg bei Tu+K+ und 77nmol/mg bei Tu+K- als die Aminosäure mit der höchsten Konzentration und war bei Tu+K+ und Tu+K- ähnlich ($p=0,443$; Tab. 19 im Anhang).

Des Weiteren wurden folgende Aminosäuren untersucht, die keine signifikanten Konzentrationsunterschiede zwischen beiden Gruppen aufzeigten: Alanin (Tu+K+: 19,25nmol/mg; Tu+K-: 20,99nmol/mg; $p=0,246$), Asparagin (Tu+K+: 1,98nmol/mg; Tu+K-: 2,26nmol/mg; $p=0,136$), Arginin (Tu+K+: 4,78nmol/mg; Tu+K-: 4,43nmol/mg; $p=0,264$), Cystin (Tu+K+: 1,43nmol/mg; Tu+K-: 2,30nmol/mg; $p=0,483$), Glutaminsäure (Tu+K+: 5,81nmol/mg; Tu+K-: 4,03nmol/mg; $p=0,103$), Serin (Tu+K+: 5,03nmol/mg; Tu+K-: 5,51nmol/mg; $p=0,198$) und Taurin (Tu+K+: 40,79nmol/mg; Tu+K-: 41,81nmol/mg; $p=0,421$; Tab. 19 im Anhang).

Thyrosin war intrazellulär im Skelettmuskel nicht nachweisbar.

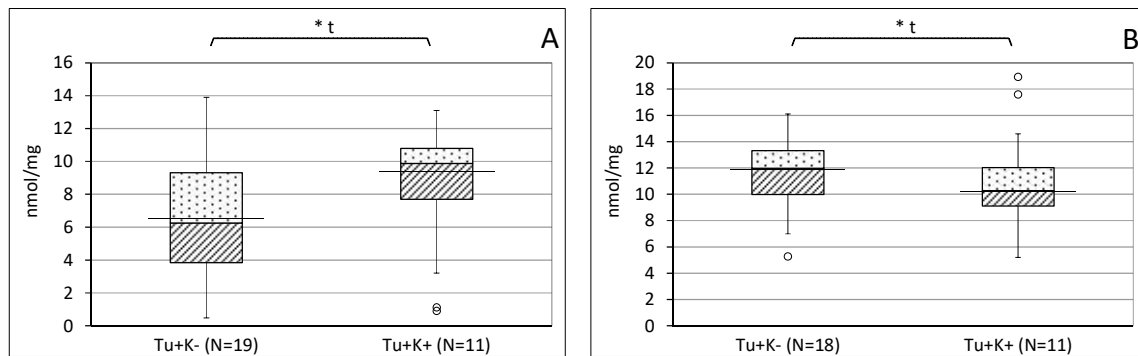


Abb. 22: Intrazelluläre Aminosäurekonzentration [nmol/mg] von (A) Aspartat und (B) Glycin.

— arithmetischer Mittelwert. ○ Ausreißer

t=T-Test; U=U-Test; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

3.3.3. Weitere Aminosäuren

Die Konzentration von Carnosin, einem Dipeptid aus L-Histidin und β -Alanin, unterschied sich nicht signifikant zwischen beiden Gruppen (Tu+K-: 38,87nmol/mg; Tu+K+: 38,93nmol/mg; $p = 0,496$).

Auch die Konzentration der nicht-proteinogenen Aminosäure Ornithin war zwischen beiden Gruppen nicht signifikant verschieden (Tu+K-: 3,25nmol/mg; Tu+K+: 3,33nmol/mg; $p = 0,452$; Tab. 19 im Anhang).

Citrullin, eine weitere nicht-proteinogene Aminosäure, und β -Alanin waren in den Proben nicht nachweisbar.

3.4. Genexpression anhand qRT-PCR

3.4.1. Housekeeping-Gene

Als Housekeeping-Gene wurden *ACTB*, *TBP* und *RPLP0* in Betracht gezogen. Nach Auswertung der einzelnen C_t -Werte und der geometrischen Mittelwerte der C_t -Werte mit der Software NormFinder.xla (Andersen et al. 2004; Stern-Straeter et al. 2009) stellte sich der geometrische Mittelwert aller drei Gene sowohl mit wie ohne $\log(N)$ Transformation als am stabilsten heraus (Tab. 6). Den geometrischen Mittelwert von mehreren gut geeigneten Housekeeping-Gene zu verwenden ermöglicht oft eine akkuratere Normalisierung als die Verwendung eines einzelnen Housekeeping-Gens (Vandesompele et al. 2002). Daher wurde dieser Mittelwert aller drei konstitutiv exprimierten Housekeeping-Gene zur Normierung verwendet. Der arithmetische Mittelwert dagegen war weniger geeignet, da die Expression der drei Housekeeping-Gene sehr unterschiedlich war, wodurch das arithmetische Mittel durch das Gen mit der höchsten Expression verzerrt wird.

Tab. 6: Ergebnisse der Untersuchung auf das stabilste Housekeeping-Gen mit der Software Normfinder.xla

Links: transformiert mit $\log(N)$

Gen-Name	Stabilitätswert
<i>ACTB</i>	0,014
<i>TBP</i>	0,006
<i>RPLP0</i>	0,004
Mean (<i>TBP</i> ; <i>RPLP0</i>)	0,004
Mean (<i>TBP</i> ; <i>ACTB</i>)	0,001
Mean (<i>ACTB</i> ; <i>RPLP0</i>)	0,001
Mean (<i>ACTB</i> ; <i>TBP</i> ; <i>RPLP0</i>)	0,001

Rechts: nicht transformiert

Gen Name	Stabilitätswert
<i>ACTB</i>	0,174
<i>TBP</i>	0,132
<i>RPLP0</i>	0,068
Mean (<i>TBP</i> ; <i>RPLP0</i>)	0,079
Mean (<i>TBP</i> ; <i>ACTB</i>)	0,020
Mean (<i>ACTB</i> ; <i>RPLP0</i>)	0,055
Mean (<i>ACTB</i> ; <i>TBP</i> ; <i>RPLP0</i>)	0,017

3.4.2. Apoptose

Es konnte weder ein signifikanter Unterschied in der relativen Expression von *CASP3* (Tu+K+: 1,17; $p=0,134$) noch des Proapoptose-Gens *BAX* (Tu+K+: 0,90; $p=0,309$) zwischen beiden Gruppen detektiert werden (Tab. 20 im Anhang).

Die Expression von *BCL2*, als antiapoptotisches Signal, war dagegen in Tu+K+ im Vergleich zu Tu+K- signifikant auf das 0,49-fache erniedrigt (Tu+K+: 0,49; $p=0,028$; Abb. 23).

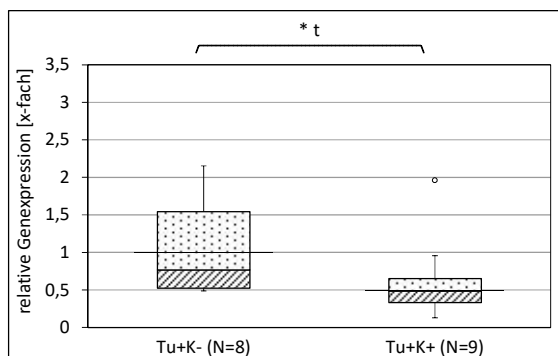


Abb. 23: Relative Genexpression von *BCL2* [x-fach].
 — arithmetischer Mittelwert. ○ Ausreißer
 t=T-Test; U=U-Test; * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$

3.4.3. Entzündung

Das von Monozyten und Makrophagen exprimierte *CD68* zeigte in Tu+K+ eine signifikant 1,48-fach erhöhte Expression gegenüber Tu+K- (Tu+K+: 1,48; $p=0,040$; Abb. 24).

Die Expression der Gene *PTGS2* (Tu+K+: 2,81; $p=0,334$), *TNF* (Tu+K+: 2,80; $p=0,310$) und *GDF15* (Tu+K+: 1,50; $p=0,455$) zeigten zwischen den Gruppen keinen signifikanten Unterschied (Tab. 20 im Anhang).

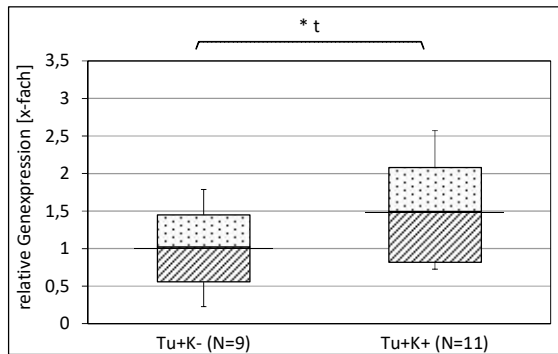


Abb. 24: Relative Genexpression von *CD68* [x-fach].
 — arithmetischer Mittelwert. o Ausreißer
 t=T-Test; U=U-Test; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

3.4.4. Zytokine

Das Zytokin *IL1β* war in Tu+K+ tendenziell 2,41-fach gegenüber Tu+K- höher exprimiert, ohne das Signifikanzniveau zu erreichen (Tu+K+: 2,41; p=0,093; Tab. 20 im Anhang).

IL6 (Tu+K+: 4,41; p=0,350), *IL8* (Tu+K+: 10,00; p=0,386) bzw. *SOCS3* (Tu+K+: 2,31; p=0,50) waren bei Tu+K+ und Tu+K- nicht signifikant exprimiert (Tab. 20 im Anhang).

3.4.5. Glutathionstoffwechsel

Die *Gamma-Glutamylcystein Synthetase* (*GCS*) war in Tu+K+ signifikant geringer exprimiert als in Tu+K- (Tu+K+: 0,831; p=0,036; Abb. 25). Sie katalysiert die Verbindung von Cystein und Glutamat, als erste geschwindigkeitsbestimmende Reaktion der Synthese des Antioxidans Glutathion.

Die Expression der *Glutathion-Disulfid Reduktase* (*GSR*) war ebenfalls in Tu+K+ im Vergleich zu Tu+K- signifikant erniedrigt (Tu+K+: 0,657; p=0,026; Abb. 25).

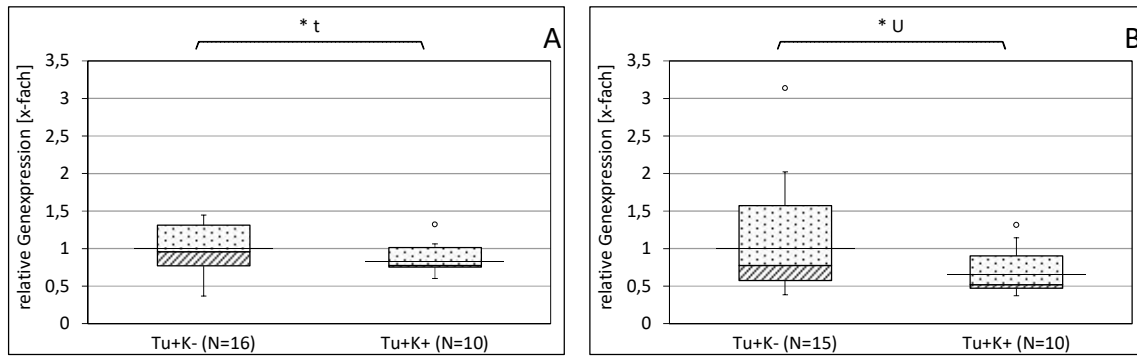


Abb. 25: Relative Genexpression [x-fach] von (A) GCS und (B) GSR.

— arithmetischer Mittelwert. ○ Ausreißer

t=T-Test; U=U-Test; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

3.4.1. MAO als eine Quelle von oxidativem Stress

Die Expression von *MAOA* war in Tu+K+ signifikant 0,19-fache geringer als in Tu+K- (Tu+K+: 0,19; p=0,030; Abb. 26 A).

Die Expression der *MAOB* war im Gegensatz zu *MAOA* in Tu+K+ signifikant 1,4f-fach höher als in Tu+K- (Tu+K+: 1,40; p=0,047; Abb. 26 B).

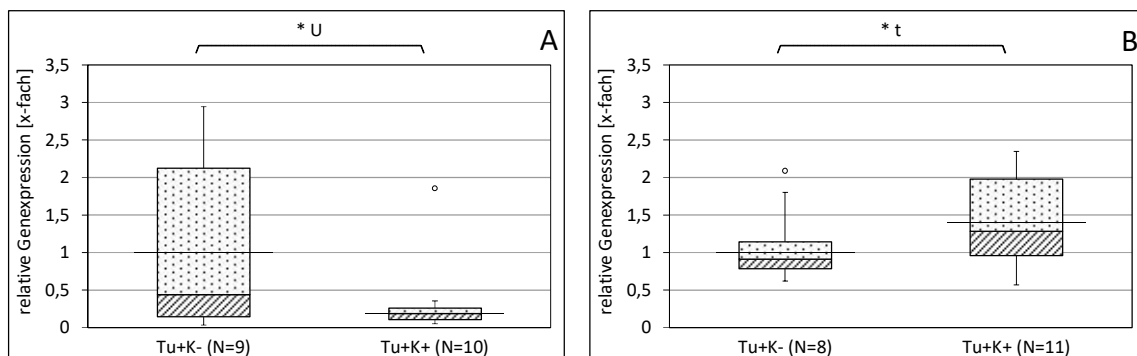


Abb. 26: Relative Genexpression [x-fach] von (A) MAOA und (B) MAOB.

— arithmetischer Mittelwert. ○ Ausreißer

t=T-Test; U=U-Test; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

3.4.2. Myogenese

Die Expression von PAX7, welches in der Regulation der Myogenese eine Rolle spielt, unterschied sich nicht signifikant innerhalb der beiden Gruppen (Tu+K+: 1,225; p=0,178; Tab. 20 im Anhang).

NOTCH2 war nicht signifikant unterschiedlich in beiden Gruppen exprimiert (Tu+K+: 1,10; p=0,362; Tab. 20 im Anhang).

NOTCH1 konnte im Muskelgewebe nicht nachgewiesen werden.

3.4.3. Proteosomale Aktivität

TRIM63 (MURF1) reguliert die proteosomale Degradation von Muskelproteinen bei Aminosäuremangel. Die Expression unterschied sich nicht signifikant innerhalb der beiden Gruppen (Tu+K+: 1,39; p=0,158; Tab. 20 im Anhang).

Die *FBXO32* Expression zeigte zwischen den Gruppen ebenfalls keinen signifikanten Unterschied (Tu+K+: 0,49; p=0,164; Tab. 20 im Anhang).

Die Expression von *PPARGC1A*, welches Foxo3 hemmt, war bei Tu+K+ im Vergleich zu Tu+K- nicht signifikant unterschiedlich (Tu+K+: 0,79; p=0,159; Tab. 20 im Anhang).

Ebenso war kein signifikanter Unterschied bei der Expression von *MMP9*, welches eine Rolle bzgl. der Proteolyse der extrazellulären Matrix spielt, in Tu+K+ gegenüber Tu-K- festzustellen (Tu+K+: 1,33; p=0,257; Tab. 20 im Anhang).

3.4.4. Aminosäure- Transporter

Der *SNAT2* zeigte eine signifikant 1,782-fach höhere Expression in Tu+K+ gegenüber Tu+K- (Tu+K+: 1,782; p=0,013; Abb. 27). Hingegen war der *LAT1* nur tendenziell in Tu+K+ höher exprimiert (Tu+K+: 1,822; p=0,072; Tab. 20 im Anhang). Allerdings bestand eine signifikante, positive Korrelation zwischen den Expressionen der beiden Transporter *LAT1* und *SNAT2* (r=0,625; p=0,002).

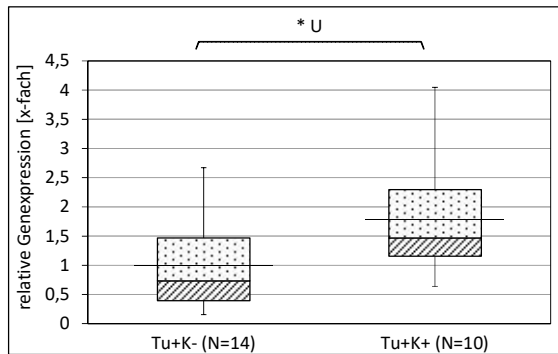


Abb. 27: Relative Genexpression von SNAT2 [x-fach].
 — arithmetischer Mittelwert. o Ausreißer
 t=T-Test; U=U-Test; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

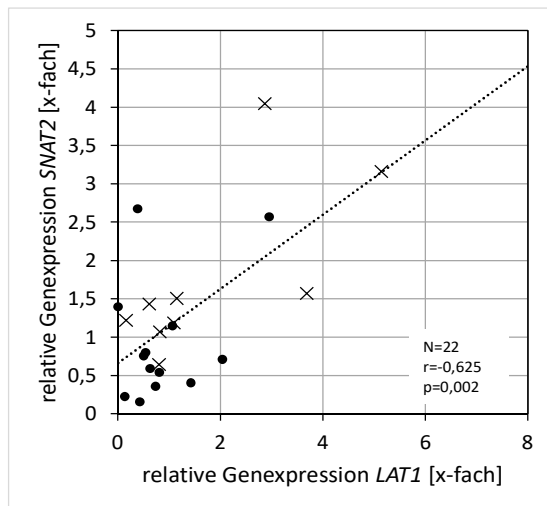


Abb. 28: Korrelation der relativen Genexpression von LAT1 mit der von SNAT2 (x-fach).
 •=Tu+K-; x=Tu+K+

3.4.5. Angiogenese

Die Expression von *VEGFA* (Tu+K+: 0,96; $p=0,409$), *VEGFB* (Tu+K+: 0,90; $p=0,262$) und *KDR* (Tu+K+: 1,00; $p=0,495$), ein Rezeptor für VEGF, der die Angiogenese reguliert, zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen Tu+K+ und Tu+K- (Tab. 20 im Anhang).

3.5. Protein-Array

Mit dem Proteomprofiler wurden relative Unterschiede der Quantität von exprimierten Proteinen, Zytokinen und Hormonen im Skelettmuskel untersucht. Die Ergebnisse sind im Folgenden in Relation zum Probenpool der Pankreaskarzinom- Patienten mit 0% Gewichtsverlust (Tu+K-) als x-fache Abweichung in der Pixeldichte dargestellt. Die Ergebnisse von Tu+K- sind somit in allen folgenden Abbildungen auf 1 gesetzt. Im Gegensatz zu den vorangestellten Untersuchungen wurde hier die Gruppe Tu+K- weiter unterteilt in Tu+K- mit 0% Gewichtsverlust und eine neue Gruppe Tu+K-/+ mit 5-10% Gewichtsverlust (s. Kapitel 2.2.8.2).

Im Folgenden werden nur Ergebnisse zu Proteinen gezeigt, die einerseits bereits in Publikationen zum Thema Tumorkachexie als relevant diskutiert wurden bzw. in der vorliegenden Untersuchung auffällige Unterschiede zwischen den Probenpools aufwiesen. Die vollständigen Ergebnisse finden sich im Anhang.

3.5.1. Apoptose

Die Proteinexpression des Fas-Liganden, der als membrangebundener Ligand den Signalweg der Apoptose aktivieren kann, war bei Tu+K-/+ gegenüber Tu+K- 2,09-fach und bei Tu+K+ 2,32-fach erhöht (Abb. 29).

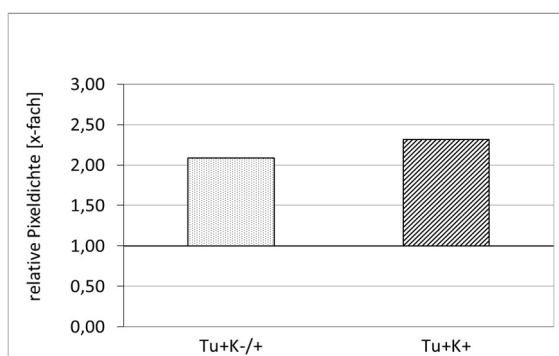


Abb. 29: Relative Proteinexpression des Fas-Liganden. Tu+K- auf 1 gesetzt (als Linie gezeigt).

3.5.2. Proteasomale Aktivität und Myogenese

Das Proteinlevel von MMP9 war in Tu+K-/+ gegenüber Tu+K- 1,25-fach und in Tu+K+ 1,35-fach erhöht (Abb. 30 A).

IL15 war in Tu+K-/+ 1,32-fach und in Tu+K+ 1,4-fach mehr exprimiert als in Tu+K- (Abb. 30 B).

Die Proteinexpression von SERPINE1 war in Tu+K-/+ um 1,42-fach höher als in Tu+K- und fiel in Tu+K+ auf das 0,78-fache ab (Abb. 30 C).

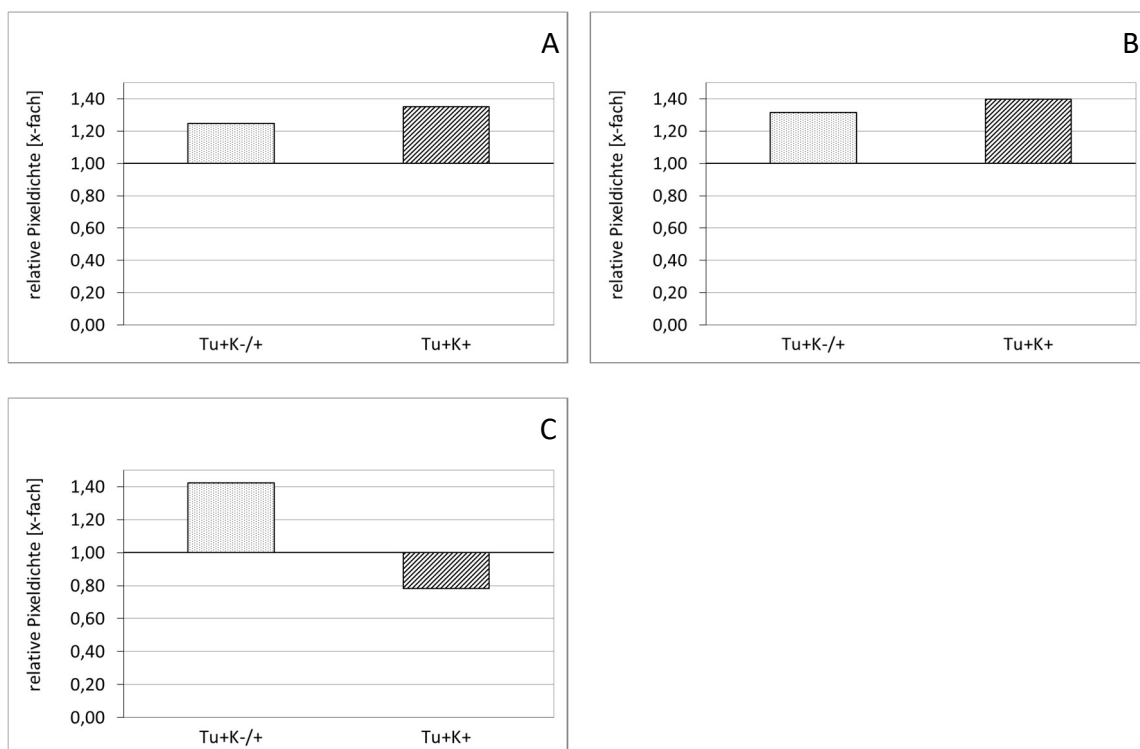


Abb. 30: Relative Proteinexpression von (A) MMP9, (B) IL15 und (C) SERPINE1. Tu+K- auf 1 gesetzt (als Linie gezeigt).

3.5.3. Pro-Inflammation

Die Proteinexpression von ...

- IL1B war in Tu+K-/ + 1,29-fach und in Tu+K+ 1,41-fach höher als in Tu+K- (Abb. 31 A).
- IL6 war in Tu+K-/ + 1,58-fach und Tu+K+ 1,50-fach höher als in Tu+K- (Abb. 31 B).
- IL8 war in Tu+K-/ + 3,71-fach und in Tu+K+ 1,48-fach höher als in Tu+K- (Abb. 31 C).
- IL32 $\alpha/\beta/\gamma$ war in Tu+K-/ + 1,42-fach und in Tu+K+ 3,03-fach höher als in Tu+K- (Abb. 31 D).
- C-reaktiven Protein war in Tu+K-/ + 1,58-fach und Tu+K+ 1,55-fach höher als in Tu+K- (Abb. 31 E).
- TNF war in Tu+K-/ + 1,86-fach und in Tu+K+ 1,87-fach höher als in Tu+K- (Abb. 31 F).
- Interferon gamma (IFNG) war in Tu+K-/ + 1,13-fach und in Tu+K+ 1,14-fach höher als in Tu+K- (Abb. 31 G).
- EGF war in Tu+K-/ + 1,61-fach und in Tu+K+ 1,89-fach höher als in Tu+K- (Abb. 31 H).
- GDF15 war in Tu+K-/ + 1,29-fach und in Tu+K+ 1,39-fach höher als in Tu+K- (Abb. 32 A).
- TNF superfamily member 13b (TNFSF13B) war in Tu+K-/ + 1,53-fach und in Tu+K+ 1,68-fach höher als in Tu+K- (Abb. 32 B).

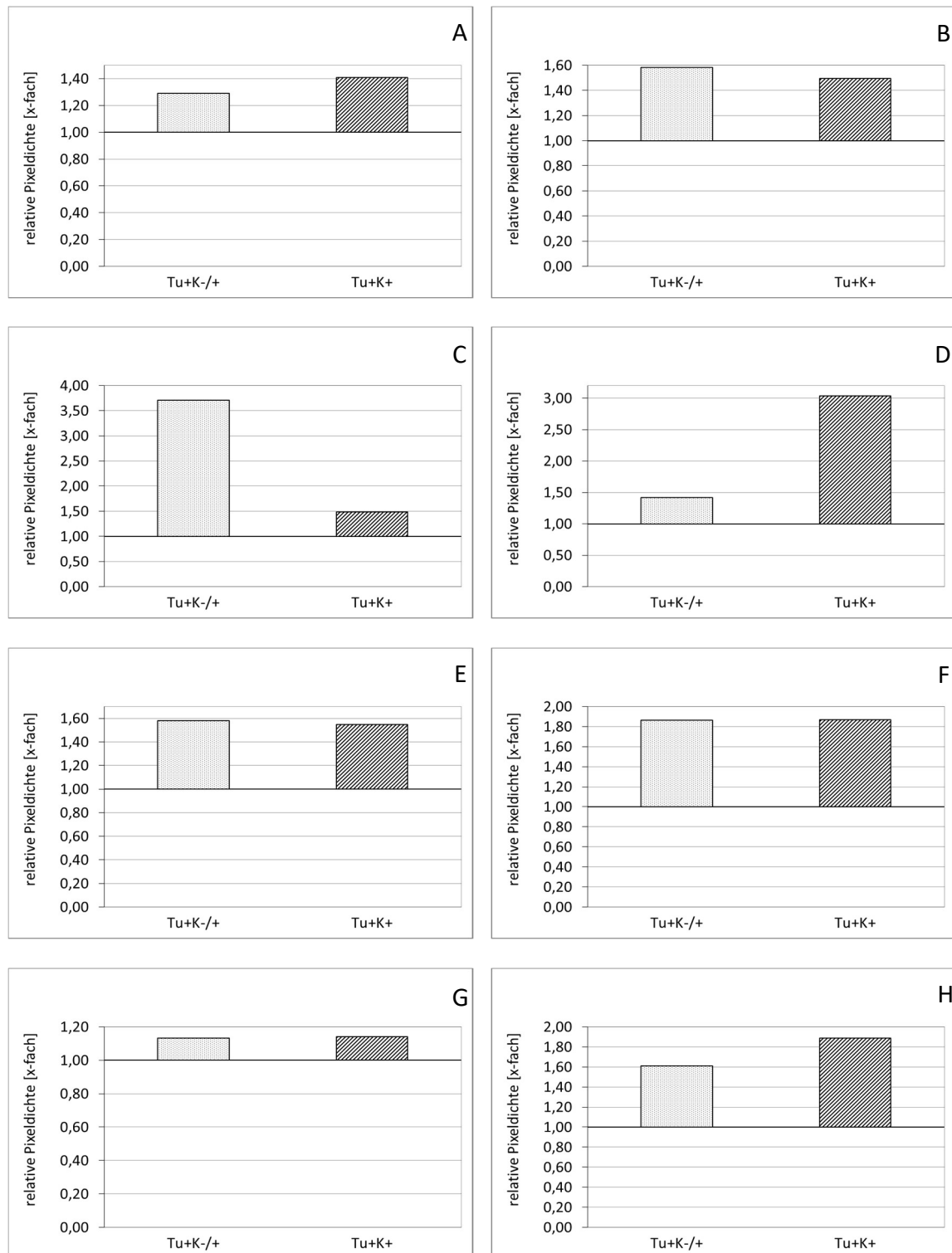


Abb. 31: Relative Proteinexpression von (A) IL1B, (B) IL6, (C) IL8 , (D) IL32α/β/γ (E) CRP, (F) TNF, (G) Interferon-γ und (H) EGF. Tu+K- auf 1 gesetzt (als Linie gezeigt).

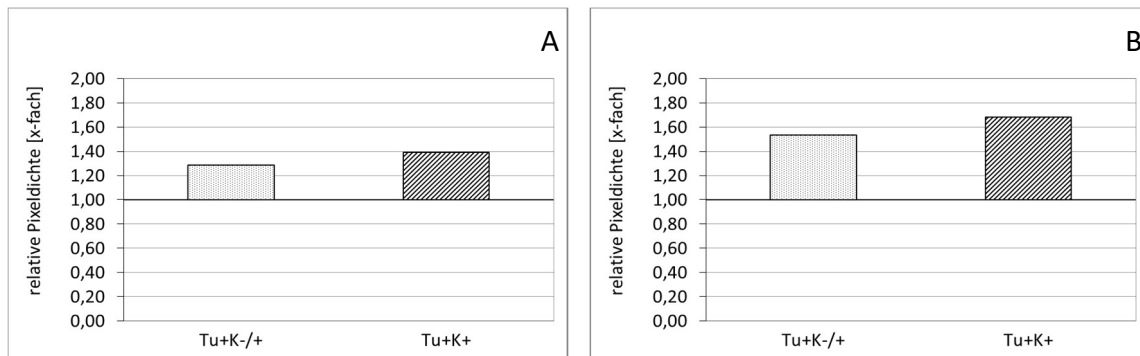


Abb. 32: Relative Proteinexpression von (A) GDF15 und (B) TNFSF13B. Tu+K- auf 1 gesetzt (als Linie gezeigt).

3.5.4. Anti-Inflammation

Das Proteinlevel von IL4 war in Tu+K-/+ 1,27-fach und in Tu+K+ 1,02-fach gegenüber Tu+K- erhöht (Abb. 33 A).

IL10 war in Tu+K-/+ um 1,2-fach und in Tu+K+ 1,33-fach gegenüber Tu+K- erhöht (Abb. 33 B).

Die Proteinexpression von IL13 war in Tu+K-/+ 1,49-fach und in Tu+K+ 1,57-fach höher als in Tu+K- (Abb. 33 C).

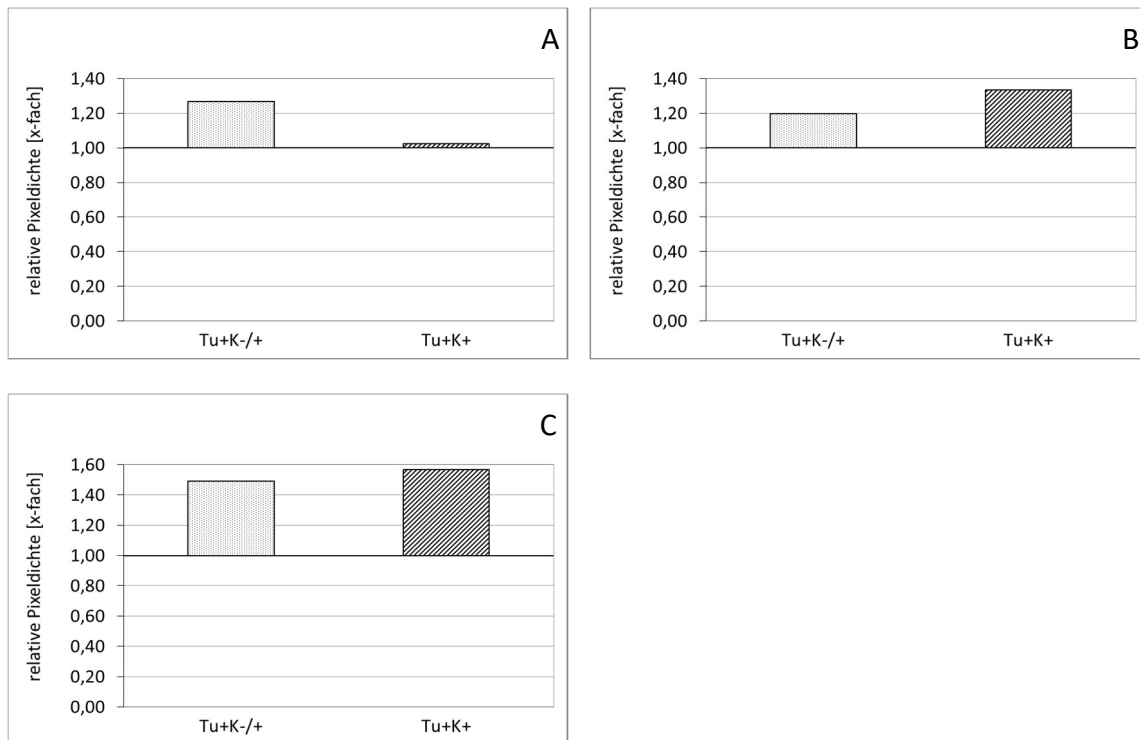


Abb. 33: Relative Proteinexpression von (A) IL4, (B) IL10 und (C) IL13. Tu+K- auf 1 gesetzt (als Linie gezeigt).

3.5.5. Angiogenese

Die Proteinexpression von VEGF war in Tu+K-/+ 1,55-fach und in Tu+K+ 1,30-fach höher als in Tu+K- (Abb. 34 A).

In Tu+K-/+ war die Proteinexpression von Angiopoietin 1 (ANGPT1) 1,93-fach und in Tu+K+ 2,07-fach höher als in Tu+K- (Abb. 34 B).

Die Angiopoietin 2 (ANGPT2) Proteinexpression war in Tu+K-/+ 1,41-fach und in Tu+K+ 1,77-fach höher als in Tu+K- (Abb. 34 C).

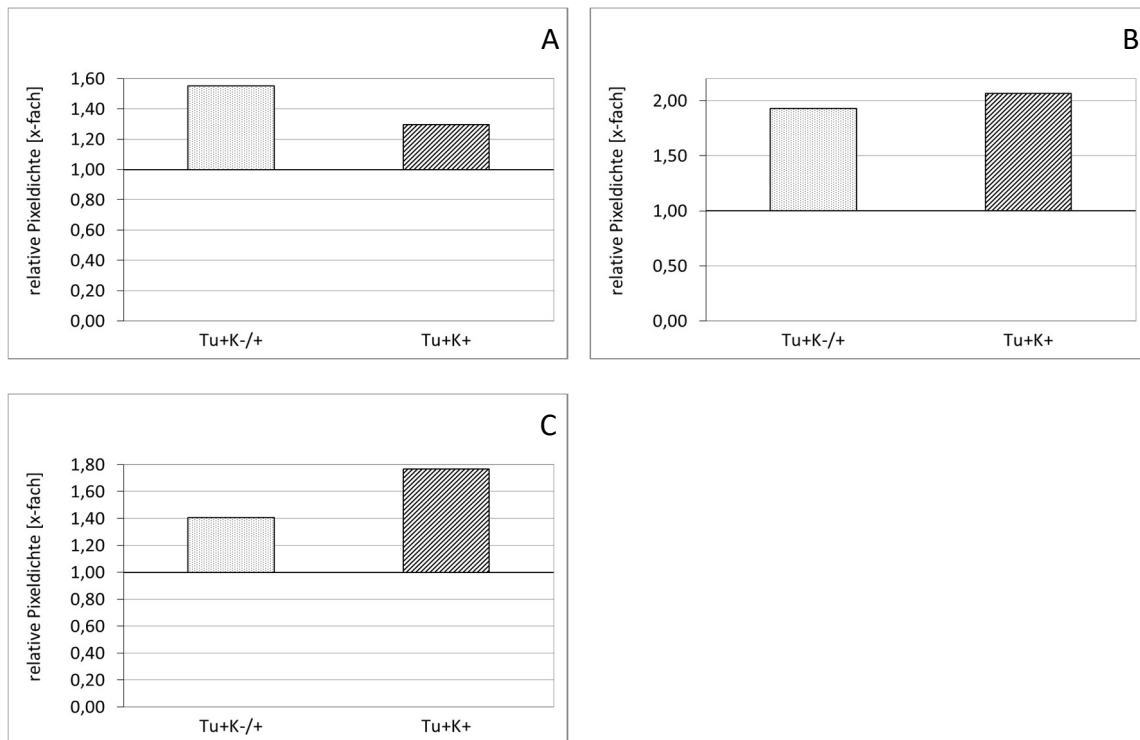


Abb. 34: Relative Proteinexpression von (A) VEGF, (B) ANGPT1 und (C) ANGPT2. Tu+K- auf 1 gesetzt (als Linie gezeigt).

3.5.6. Anti-Angiogenese

Die Proteinexpression vom Platelet Factor 4 (PF4) war in Tu+K-/+ auf das 0,29-fache und in Tu+K+ auf das 0,16-fach von Tu+K- reduziert (Abb. 35).

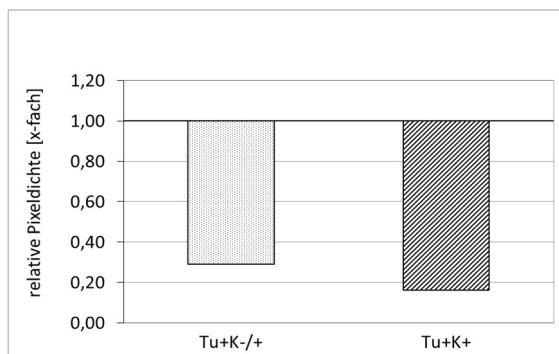


Abb. 35: Relative Proteinexpression von PF4. Tu+K- auf 1 gesetzt (als Linie gezeigt).

4. DISKUSSION

4.1. Limitationen

4.1.1. Patientenkollektiv

Eine Herausforderung bei klinischen Studien ist die Homogenität des Kollektives in Bezug auf wesentliche Einflussfaktoren: Neben Geschlecht und Alter sind auch Komorbiditäten, Einnahme einer hohen Anzahl verschiedener Medikamente mit ihren Wirkungen und Nebenwirkungen, ein Abusus von Alkohol oder Nikotin, sowie unterschiedliche körperliche Aktivität übliche Confounder.

So ist bekannt, dass Glukokortikoide zu einer Atrophie des Muskels führen können (Tisdale 2009). Mantovani et al. zeigten, dass die Einnahme von COX2-Hemmern bei Kachexie zu einer Gewichtszunahme führen (2010). Eine Muskelatrophie des Fasertyp I konnte bei Rauchern beobachtet werden (Montes de Oca et al. 2008). Darüber hinaus waren neben einer reduzierten Proteinsynthese, FBXO32 und MSTN bei Rauchern gegenüber Nicht-Rauchern erhöht exprimiert (Petersen et al. 2007). Erhöhter Alkoholkonsum kann zu einer Myopathie mit einer Muskelmassenabnahme von ca. 30% führen. Hierbei ist offenbar hauptsächlich der Muskelfasertyp II betroffen (Preedy et al. 2001). Die klinisch erhobenen Daten der vorliegenden Arbeit beschränkten sich auf die Angabe, ob Alkohol oder Zigaretten konsumiert, bzw. welche Medikamente eingenommen wurden und berücksichtigten nicht die Dauer oder Menge des Konsums bzw. der Einnahme. In den gewählten Kachexie-bezogenen Gruppen waren wenige Patienten von diesen Einflussfaktoren betroffen und die unterschieden sich nicht signifikant in diesen Punkten (Tab. 5, S. 75).

Bezüglich eines Diabetes mellitus Typ 2 unterschieden sich die beiden Gruppen aber signifikant (Tu+K+: 9; TU+K-: 2; $p=0,001$; Tab. 5, S. 75). Dabei war bei 6 von 11 Patienten das Datum der Erstdiagnose eines Diabetes mellitus Typ 2 bekannt und bei 4 Patienten wurde diese Erstdiagnose maximal 9 Monate vor der Operation und somit vor der Erstdiagnose des Pankreaskarzinoms gestellt. Ein Patient mit Diabetes mellitus Typ 2 wies keinen Gewichtsverlust auf und ein anderer Proband hatte einen Diabetes mellitus Typ 2 schon seit über 10 Jahren. Ob der Diabetes mellitus Typ 2 erst im Rahmen der

Insulin-Resistenz der Kachexieentwicklung (s. Kap. 1.8) oder bereits vorher inzidentell aufgetreten ist, kann nicht beurteilt werden. Der zeitliche und ursächliche Zusammenhang zwischen der Insulinresistenz und dem Gewichtsverlust bleibt unklar.

Ein standardisierter Fragenkatalog, eine körperliche Untersuchung und eine zuvor festgelegte Blutuntersuchung zur präoperativen Auswahl der Studienteilnehmer wären nach Planung der Studien sinnvoll gewesen, um vollständige Angaben zum Patientenkollektiv zu erhalten. Da der Aufbau der Gewebebank von einer anderen Arbeitsgruppe und schon vor Studienbeginn initiiert wurde, konnte hierauf kein Einfluss genommen werden.

Eine weitere Einschränkung der Studienergebnisse liegt im Fehlen einer gesunden Kontrollgruppe zur Darstellung der physiologischen Durchschnittswerte und Variabilität der in dieser Studie angewandten Methoden und Analysen.

4.1.2. Ein-/ Ausschlusskriterien

Auch wenn der Gewichtsverlust schon seit über 30 Jahren ein Hauptkriterium der Tumorkachexie ist (Fearon 2012), wird dieses alleinige Kriterium dem multifaktoriellen Syndrom nicht gerecht. So ist beispielsweise ein Gewichtsverlust von 5 kg bei einem Ausgangs-BMI von 22 schwerwiegender, als bei einem Ausgangswert von 35 (Fearon et al. 2011). Ein BMI von 18,5 gilt schon allein als Untergewicht (WHO 2000, S. 9) und geht mit einer Konstitution - ähnlich der Kachexie - einher.

Erschwerend kommt hinzu, dass die wenigsten Probanden sich täglich wiegen und dies dokumentieren und die Muskelmasse nicht gemessen wird. Folglich ist die Angabe des Zeitraums des Gewichtsverlusts, basierend auf einem anamnestisch erhobenen Ausgangswert, ungenau und variiert zwischen den kachektischen Patienten. Des Weiteren kann bei Tumorkachexie häufig eine Hypoalbuminämie beobachtet werden (Fearon et al. 2012), welche zu Ödemen führt. Durch die Wassereinlagerung im Gewebe und das Tumorwachstum kann der Gewichtsverlust maskiert und somit falsch negativ gewertet werden.

Nach Sichtung der Literatur, der vorhandenen Proben und der dazugehörigen Datenbank wurde, wie beschrieben, 10% und mehr Gewichtsverlust innerhalb von 6 Monaten vor der Operation als Kriterium zur Gruppeneinteilung gewählt.

Chemotherapie kann zu Anorexie und Nahrungsmittelaversion führen (Tisdale 2002), Patienten mit Chemotherapie wurden daher ausgeschlossen. Patienten mit Zweitumoren oder chronisch-entzündlichen Erkrankungen in der Anamnese oder zum Zeitpunkt der Entnahme wurden ebenfalls ausgeschlossen.

Eingeschlossen wurden nur Patienten, deren Pankreastumor nach der Operation histologisch gesichert werden konnte.

Nach Anwendung dieser strengen Ein- und Ausschlusskriterien, konnte aus einem Probenpool von über 150 Proben 36 Proben gewonnen werden (Tab. 2; S. 42).

4.1.3. Gewebeproben

Da es sich um Gewebeproben von Patienten handelt, konnten nur kleine Muskelproben gewonnen werden, was zu einer begrenzten Faseranzahl pro Muskelquerschnitt führte. Hinzu kommt, dass teilweise die zur Verfügung stehenden Proben mit intaktem Gewebezusammenhang zu klein waren, um diese für alle vier Untersuchungsmethoden verwenden zu können. Darüber hinaus handelte es sich in einigen Fällen beim entnommenen Gewebe nicht um Muskelgewebe oder es fehlten klinische Daten, sodass diese Gewebeproben und Patienten aus den Untersuchungen ausgeschlossen werden mussten.

Trotz sorgfältiger Kryoasservierung bei -80°C wurden in der histologischen Untersuchung in vielen Proben Gefrierartefakte sichtbar. U.a. ist das Messen der Fasergröße bei starken Gefrierartefakten unmöglich (Meng et al. 2014), wodurch einige Proben aus der Studie ausgeschlossen werden mussten und sich somit die Anzahl der eingeschlossenen Probanden weiter dezimierten. Die auswertbare Probenanzahl insbesondere für die histologische Untersuchung war letztlich zu klein für statistisch belastbare Aussagen, es konnten jedoch Auffälligkeiten und Tendenzen beschrieben werden.

Des Weiteren können biochemische Prozesse im Muskelgewebe auch nach der Entnahme noch weiter ablaufen und somit Ergebnisse der PCR- und Proteinanalyse verfälschen. Dies mindert die statistische Aussagekraft der Ergebnisse bzw. muss im Rahmen der Bewertung der Ergebnisse entsprechend gewürdigt werden. Die Kombination der Ergebnisse aus gezielt gewonnenen Muskelbiopsien mit einer homogenen Tumorentität und umfangreichen klinischen Daten stellt jedoch ein wertvolles Kollektiv dar.

4.2. (Immun-) Histochemie

4.2.1. Morphometrie und Faserkomposition

Die drei im M. rect. abd. vorkommenden Fasertypen, I, IIa und IIx, wiesen eine mosaikartige räumliche Verteilung auf, wie bereits von Sciote et al. (1994) beschrieben. Die Ergebnisse der Faserkomposition (I: Tu+K-: 46%; Tu+K+: 50%; $p=0,355$; IIa: Tu+K-: 39%; Tu+K+: 42%; $p=0,376$; IIx: Tu+K-: 15%; Tu+K+: 7%; $p=0,419$) sind vergleichbar mit denen von Weber et al. (2007; 2009): Fasertyp I und IIa sind die am häufigsten vorliegenden Fasertypen und haben zudem bei Kachexie die größte Einzel- und Gesamtfaserfläche. Fasertyp IIx ist am wenigsten repräsentiert.

Die Hauptmanifestation der Tumorkachexie ist der Muskelschwund (Johns et al. 2013). Bezogen auf die vorliegende Untersuchung bedeutet dies, dass eine Größenabnahme des Muskelquerschnitts zu erwarten ist. Diese kann sich durch einen Faserverlust, Muskelfaserflächenabnahme im Querschnitt oder einer Muskelfaserdichtezunahme durch Abnahme der interstitiellen Querschnittsfläche verkleinern.

In der vorliegenden Untersuchung konnte jedoch weder eine Abnahme der Muskelfaserfläche im Querschnitt (Tu+K+: $3297\mu\text{m}^2$; Tu+K-: $2574\mu\text{m}^2$; $p=0,123$) noch der Muskelfaserdichte (Tu+K+: $268,92/\text{mm}^2$; Tu+K-: $329,68/\text{mm}^2$; $p=0,161$) bestätigt werden, während über die Gesamtfaseranzahl und -fläche des Muskels keine Aussage getroffen werden kann. Vielmehr zeigte sich eine tendenzielle Zunahme der Muskelfasergröße des Typs I bei Kachexiepatienten (Tu+K-: $1920\mu\text{m}^2$; $N=9$; Tu+K+: $2991\mu\text{m}^2$; $N=6$; $p=0,096$) bei nicht signifikanter Kaliberveränderung der beiden anderen Fasertypen. Weber et al. (2007) konnten hingegen am M. vast. lat., einem klinisch auffällig von Kachexie betroffenen Muskel, die Erwartung einer Flächenabnahme des Muskelquerschnitts teilweise bestätigen. Sie beobachteten eine signifikante Fasergrößenabnahme des Muskelfasertyps IIx und eine tendenzielle Abnahme der Fasergröße des Muskelfasertyps I. Die Abnahme der Muskelfasergröße des Typs IIa war nicht signifikant. Weber et al. (2009) zeigten eine allgemeine signifikante Abnahme der Muskelfasergröße im M. vast. lat. Die einzelnen Muskelfasertypen wurden in dieser Studie nicht untersucht. Johns et al. (2014) gelang, wie in der vorliegenden Untersuchung, zunächst kein Nachweis einer Fasergrößenabnahme des M. rect. abd.

Erst beim Vergleich gesunder Probanden mit Patienten mit über 2% Gewichtabnahme und geringer Muskelmasse, welche im CT nachgewiesen wurde, zeigte sich eine Muskelfasergrößenabnahme allgemein, die sowohl Fasertyp I als auch IIa betraf, wobei der Muskelfasertyp IIx so selten vorkam, dass er nicht quantifiziert wurde.

Auffällig ist, dass die gemessene mittlere Fasergröße zwischen den drei genannten Studien, sowie der vorliegenden Arbeit stark differiert (Tab. 7). Die Muskelfasern des Oberschenkelmuskels scheinen größer zu sein als die des Bauchmuskels. Dies ist wahrscheinlich in der Funktion der Muskeln begründet: Der M. rect. abd. ist eher ein „Haltemuskel“, der M. vast. lat. ist an der Lokomotion entscheidend beteiligt. Des Weiteren kann vermutet werden, dass der mittlere Muskelfaserquerschnitt eines gesunden Menschen größer ist, als der eines bereits am Tumor erkrankten Patienten, selbst wenn dieser noch nicht kachektisch ist. Darüber hinaus wurden in der vorliegenden Studie mittels „Feret“ (S. 51) nur tatsächlich quer geschnittene Muskelfasern ausgewertet, dieses Kriterium wurde in den anderen Studien nicht zugrunde gelegt. Somit sind die bisherigen Studien nur schwer vergleichbar.

Auch bezüglich der Faserdichte wurde in der vorliegenden Untersuchung kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen gefunden. Johns et al. (2014) fanden mit oben genannter Gruppierung der Patienten ebenfalls keinen Unterschied. Weber et al. (2009) stellten hingegen eine tendenzielle Zunahme der Faserdichte fest.

Die vorliegende Studie ist mit den Studien von Weber et al. (2007), Weber et al. (2009) und Johns et al. (2014) nur begrenzt vergleichbar, da in allen drei Studien die kachektische Patientengruppe mit gesunden Probanden ohne Gewichtsverlust verglichen wurde. Des Weiteren hatten Weber et al. (2007) Patienten mit Pankreas-, Magen-, Kolonkarzinom oder chronischer lymphatischer Leukämie eingeschlossen, welche zudem im Mittel einen größeren Gewichtsverlust (Mittelwert: 22%) als die Patienten in der vorliegenden Studie hatten.

Darüber hinaus untersuchten Weber et al. (2007; 2009) jeweils den M. vast. lat. In der vorliegenden Studie und in der Untersuchung von Johns et al. (2014) hingegen wurde der M. rect. abd. analysiert.

Es liegen bisher zu wenige humane Studien mit jeweils nur geringer Fallzahl vor, in denen der Skelettmuskel histologisch untersucht wurde, um eine definitive Aussage über eine eventuell numerische oder zelluläre Muskelfaseratrophie zu machen.

Tab. 7: Vergleich der histologischen Studienergebnisse. Ohne / mit Kachexie.
-: nicht untersucht. +p<0,1; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. Σ =alle Fasern.

	Fasergröße (μm^2)	Faserdichte (Anzahl / cm^2)	Kapillardichte (Anzahl / mm^2)
Vorliegende Studie	Σ : 2574 / 3297	Σ : 330 / 269	Σ : 351 / 374
M. rect. abd.	I: 1920 / 2991+	I: 147 / 114	
Tu+K- / Tu+K+	IIa: 3165 / 3848	IIa: 130 / 129	
	IIx: 3232 / 2452	IIx: 52 / 26	
Johns et al. (2014)	Σ : 4045/2979*	Σ : 1226 / 1263	-
M. rect. abd.	I: 3653 / 2705*	I: 653 / 596	
Gesund / Tu+K+	IIa: 4365 / 3238*	IIa: 682 / 676	
	IIx: -	IIx: -	
Weber et al. (2009)	Σ : 4181 / 2854*	Σ : 229 / 285+	Σ : 358 / 335
M. vast. lat.	I: -	I: -	
Gesund / Tu+K+	IIa: -	IIa: -	
	IIx: -	IIx: -	
Weber et al. (2007)	Σ : -	-	-
M. vast. lat.	I: 4675 / 3723+		
Gesund / Tu+K+	IIa: 6942 / 3207		
	IIx: 3765 / 2105*		

In anderen publizierten Studien wurde der M. rect. abd. bei Kachexie nur quantitativ mittels Western-Blot auf den Myosingehalt hin untersucht, aber nicht histologisch durch Färbung quantifiziert. Eine signifikante Abnahme des Myosins im M. rect. abd. wurde durch Schmitt et al. (2007b), Eley et al. (2007) und Zampieri et al. (2013) gezeigt. Schmitt et al. (2007b) vermuteten, dass es sich nicht um einen unspezifischen Proteinverlust des

Muskels handelt, sondern vor allem das Myosin verloren geht, während der Aktinverlust geringer ist.

Die histologischen Ergebnisse der vorliegenden Studie können als erster Hinweis dahingehend interpretiert werden, dass Stadien-Unterschiede der Kachexie berücksichtigt werden müssen, dies betrifft die quantitative Ausprägung der Kachexie bezüglich Gewichtsverlust in Prozent, aber auch die Muskelmassenänderungen in verschiedenen Regionen. Das Gewicht ist sicher ein unzureichender Parameter des Muskelmassenverlustes. Es kann vermutet werden, dass sich die Patienten, deren Muskelbiopsien in der vorliegenden Studie untersucht wurden, bei der Diagnose des Pankreaskarzinoms noch vor dem histologisch sichtbaren Muskelabbaustadium befanden (Frühstadium!). Ausgeschlossen werden kann nicht, dass ein frühes Muskelabbaustadium vorliegt.

4.2.2. Kapillarkontakte und -dichte

Die oxidativen, langsam-zuckenden Muskelfasern des Typs I, die aufgrund des hohen Myoglobingehalts, im Gegensatz zu den weißen schnell kontrahierenden Muskelfasern vom Typ IIx, rot sind, weisen die höchste Kapillardichte auf (Engelhardt und Aurich 2010). Die hier ermittelten Daten spiegeln dies mit 1,8 (Tu+K-) und 2,4 (Tu+K+) Kapillarkontakten des Fasertyps I im Vergleich zu 1,7 (Tu+K-) und 1,4 (Tu+K+) Kapillarkontakten des Fasertyps IIx wider. Für den Fasertyp IIa, der sehr viele Mitochondrien und sowohl einen oxidativen als auch begrenzt glykolytischen Stoffwechsel aufweist, zeigten sich mit 1,8 (Tu+K-) und 2,0 (Tu+K+) Kapillarkontakten mittlere Werte.

Im Vergleich zur Kontrolle ergab sich eine tendenzielle Zunahme der Kapillarkontakte des Muskelfasertyps I um 39% bei Kachexie ($p=0,075$), sowie bei allen Muskelfasertypen zusammen um 33% ($p=0,106$).

Die Kapillardichte, bezogen auf die gesamte Muskelfläche im Querschnitt, veränderte sich jedoch nicht signifikant im M. rect. abd. (Tu+K-: $351/\text{mm}^2$; Tu+K+: $374/\text{mm}^2$; $p=0,38$). Entsprechende Daten lieferten ebenfalls Weber et al. (2009).

Die in dieser Studie tendenziell vermehrten Kapillarkontakte gehen offenbar mit ebenfalls tendenziell größer werdenden Muskelfaserquerschnitten des Fasertyps I ($p=0,096$), also einer größeren Zellmembran- bzw. Kontaktfläche einher, wie auch die signifikante Korrelation der beiden Merkmale vermuten lässt ($r=0,820$; $p<0,001$).

Es ist vorstellbar, dass die mehrfach beschriebenen erhöhten Entzündungsmarker (CRP, TNF, IL1, IL6) bei Tumorkachexie (Fearon et al. 1998; Iwase et al. 2004; Martignoni et al. 2005) eine vermehrte Angiogenese im Tumor, sowie im Muskel induzieren. Leibovich et al. (1987) sprechen TNF u.a. eine potenziell induzierende Rolle für das Blutgefäßwachstums zu. Burton und Libutti (2009) beschreiben den Angiogenese-fördernden bzw. -hemmenden Effekt von TNF als Dosis-abhängig. Als Beleg für den o.g. proangiogenen Effekt kann herangezogen werden, dass bei Patienten mit Tumorkachexie im Serum VEGFA mit CRP signifikant positiv korreliert (Krzystek-Korpacka et al. 2008). Auch die in der vorliegenden Studie erhöhte Expression von CD68, welchem eine gefäßproliferierende Eigenschaft zugeschrieben wird, stützt diese Vermutung. Johns et al. (2013) schrieben ebenfalls, dass Tumorzellen proinflammatorische Mediatoren produzieren, die u.a. auch die Angiogenese fördern könnten. Diese könnten sich theoretisch nicht nur auf den Tumor und die Metastasen, sondern auch auf den Skelettmuskel auswirken und würden somit eine Zunahme der Kapillaren im Skelettmuskel bei Tumorkachexie erklären. Bisher sind keine Studien veröffentlicht, die eine „Myositis“ als eine charakteristische, eventuell frühe Phase, des Muskelschwundes beschreiben. Es sind antiinflammatorische Therapieansätze publiziert, deren Effekt auf die Muskelmorphologie und Genexpression jedoch noch weitgehend unklar ist und möglicherweise besonders in einem frühen Stadium sinnvoll sind. Die vorliegenden klinischen Daten weisen darauf hin, dass Stadien-abhängig humane Muskelanalysen zur sinnvollen Weiterentwicklung der antikachektischen Therapie erforderlich sind.

4.2.3. Zentralisierte Zellkerne

Von zentralisierten Zellkernen kann gesprochen werden, wenn in über 3% der Fasern im transversen Anschnitt Zellkerne vorgefunden werden, die nicht unter dem Sarkolemm peripher, sondern innerhalb der Muskelzelle liegen (Greenfield 1957).

In der vorliegenden Untersuchung nahm bei Kachexie der Anteil aller Muskelzellen mit zentralisierten Zellkernen tendenziell zu (Tu+K-: 13%; Tu+K+: 18%; $p=0,085$). Der Gewichtsverlust und der Anteil aller Muskelzellen mit zentralisierten Zellkernen korrelieren signifikant positiv ($r=0,527$; $p=0,043$). Dabei war der Anteil an Zellen mit zentralisierten Zellkernen im Skelettmuskel innerhalb des Muskelfasertyps I signifikant (Tu+K-: 5%; Tu+K+: 12%; $p=0,031$) und innerhalb des Muskelfasertyps IIx tendenziell (Tu+K-: 19%; Tu+K+: 23%; $p=0,067$) erhöht.

Bisher wurde in klinischen Studien zur Tumorkachexie wenig über zentralisierte Zellkerne berichtet. Zampieri et al. (2013) beschrieben erstmals bei 10 Patienten mit Kolonkarzinom zentralisierte Zellkerne, machten jedoch keine Angaben dazu, ob bei diesen Patienten bereits ein Gewichtsverlust eingetreten war. Im Vergleich zu Probanden, die aufgrund einer nicht-neoplastischen Ursache operiert wurden, waren signifikant mehr zentralisierte Zellkerne pro ausgewertete Muskelfaserfläche gefunden worden (Tumorpatienten: $9,15\% \pm 8,9\%$; Kontrollgruppe: $0,6\% \pm 0,9\%$; $p=0,0003$). Judge et al. (2018) verglichen Patienten mit Pankreaskarzinom und Patienten, die aufgrund einer gutartigen Erkrankung abdominell operiert wurden. Sie wiesen auf zentralisierte Zellkerne bei Patienten mit Tumorkachexie in ihren Abbildungen hin, machten aber keine numerische Aussage hierzu. Im Mausmodell mit induziertem Lungenkarzinom und Tumorkachexie wurden ebenfalls signifikant mehr zentralisierte Zellkerne im Diaphragma sowie im M. gastrocnemicus mit einem Anteil von ca. 1-3% beschrieben (Salazar-Degracia et al. 2016). Als Ursache wurde ein pathophysiologisch an der Kachexie beteiligter Reperaturmechanismus vermutet. Vermehrt zentralisierte Zellkerne können auch ein unspezifisches Zeichen für chronische Neuropathien oder Myopathien sein (Dubowitz et al. 2007).

Es ist bekannt, dass die Satellitenzellen für die Regeneration der Muskelzellen und -fasern verantwortlich sind. Hierfür werden die Satellitenzellen lokal aktiviert,

proliferieren, fusionieren und bilden neue Skelettmuskelfasern oder -faserabschnitte. In den regenerierten Muskelzellen finden sich zunächst zentralisierte Zellkerne, bevor diese in die Peripherie der Zelle wandern (Hawke und Garry 2001). So können vermehrt zentralisierte Zellkerne in der Muskelfaser während des Wachstums, bei verschiedenen Muskelerkrankungen, -verletzungen und während der Regeneration auftreten (Carlson 1973; Bruusgaard et al. 2003). Balisardo Minamoto et al. (1999) entdeckten zentralisierte Kerne vermehrt nach chronischer Muskelkontusion. Im Gegensatz zu regenerativen Zellkernen, die anfangs internal bleiben (Folker und Baylies 2013), beschreiben Sudo und Kano (2009), dass apoptotische Zellkerne, indentifiziert mit der TUNEL-Methode, subsarkolemmal bleiben, sodass Apoptose als Ursache für die vorliegenden Befunde eher ausscheidet.

In den Korrelationen ergab sich kein deskriptiver Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen der Genexpression der E3-Ligasen des Ubiquitinsystems *TRIM63* und *FBXO32*, welche an der Proteolyse des Skelettmuskels beteiligt sind, und dem Anteil der zentralisierten Zellkerne (s. Tab. 22 im Anhang).

Dies legt die Vermutung nahe, dass die erhöhte Anzahl zentralisierter Zellkerne im Skelettmuskel ein Hinweis auf einen Ausgleich eines möglichen Muskelzellverlust durch Regeneration im Stadium der frühen Kachexie ist. Eine lokale parakrine Ausschüttung von Entzündungsmediatoren soll die Satellitenzellaktivierung (etwa nach Belastung oder Trauma) fördern. Dies wäre somit kein Hinweis auf einen Zelluntergang, jedoch ein Marker für die Muskelzellreparatur (Folker und Baylies 2013). Damit vereinbar ist das vorliegende Ergebnis, dass bei Kachexie keine Zellzahl- oder Zellgrößenabnahme zu sehen war. Allerdings ist die Probenanzahl in der vorliegenden histomorphologischen Untersuchung für eine definitive Aussage zu gering und kann allenfalls zur Hypothesengenerierung herangezogen werden.

Um den molekularen Mechanismus dieser Kachexie-assoziierten Myopathie histologisch weiter einzugrenzen, und Hinweise zu erlangen, ob es sich um Effekte der Regeneration, der Denervation, der Apoptose oder um eingewanderte Makrophagen handelt, sowie um die Anzahl der Satellitenzellen zu bestimmen, könnte in zukünftigen Studien mit spezifischen (immun)histochemischen Färbungen diesen Fragestellungen

nachgegangen werden. Zampieri et al. (2013) fanden ausschließlich in Muskelbiopsien von Tumorpatienten N-CAM- (Markierung des Neural cell adhesion molecule), sowie embryonale-MHC- positive Muskelfasern; in Proben von Nicht-Tumorpatienten konnten sie diesbezüglich keine positiven Zellen sehen. Mittels DAB-, Pax7- Färbung oder einer Markierung des N-CAM lassen sich die Satellitenzellen darstellen, sowie mittels TUNEL-Färbung apoptotische Zellen nachweisen. Eine saure Phosphatase-Färbung, eine spezifische CD68- oder CD163- Färbung kann eine vermehrte Makrophagen-Aktivität aufzeigen. Auf der Ebene der Genexpressionen wurde in der vorliegenden Studie dieser Frage weiter nachgegangen (s. S. 124; Abs. 4.4.1).

Weitere Analysen auf der Grundlage genauerer Quantifizierung des Muskelschwunds und weiterer Differenzierung nach definierten Stadien der Tumorkachexie sind erforderlich, um eine Überlappung der Effekte der frühen Kachexie mit den Symptomen einer voll entwickelten Kachexie und somit eine Maskierung von diagnostisch wertvollen Markern für die frühe Kachexie zu vermeiden.

4.3. Intrazelluläre Aminosäurekonzentration

4.3.1. Leucin

In der vorliegenden Studie wurde in Skelettmuskelbiopsien der Tumorkachexiegruppe eine um 20% signifikant (Tu+K-: 2,56nmol/mg; Tu+K+: 2,04nmol/mg; $p=0,022$) erniedrigte intrazelluläre Konzentration von Leucin gegenüber der Patientengruppe ohne Gewichtsverlust gemessen. Der Gewichtsverlust scheint sich jedoch nur zu 14% durch die abnehmende Leucinkonzentration zu erklären oder umgekehrt ($r=-0,374$; $b=0,14$; $p=0,046$).

Es stellt sich zunächst die Frage, wodurch eine reduzierte intrazelluläre Leucinkonzentration bedingt ist. Mögliche Ursachen können (I) eine verminderte Aufnahme mit der Nahrung, (II) eine verminderte Aufnahme durch die Skelettmuskelzelle, (III) ein vermehrter Verbrauch oder (IV) eine erhöhte Proteinsynthese bzw. eine verringerte Proteolyse sein. Da Daten zur Aminosäurekonzentration in Blutplasmaproben fehlen sind nur Vermutungen möglich.

(I) Aufnahme von Aminosäuren über die Nahrung: Eine Ursache für den intrazellulären Leucinmangel könnte eine verminderte externe Aminosäureaufnahme durch einen reduzierten Appetit bei Tumorpatienten sein (Durham et al. 2009; Morley et al. 2006). Da Leucin eine essentielle Aminosäure ist, die der Körper nicht selbst synthetisieren kann, entsteht auf diese Weise definitiv ein Mangel. Sofern dies als alleinige Ursache betrachtet wird, sollten allerdings in diesem Fall auch weitere essentielle Aminosäuren betroffen sein. Dies konnte jedoch in der ASA intrazellulär in der vorliegenden Untersuchung nicht gezeigt werden.

Eine alleinige Leucin-Substitution verbessert sowohl in Mausmodellen, wie auch in klinischen Studien den Proteinmetabolismus des Muskels zugunsten der Proteinsynthese und einer verminderten Proteolyse (Tayek et al. 1986; Yamanaka et al. 1990; van Norren et al. 2009). Es muss aber beachtet werden, dass Leucin nicht nur den Muskel anabol beeinflusst, sondern auch das Tumorwachstum fördern könnte (Liu et al. 2014). Auch eine Supplementierung mit β -Hydroxy β -Methylbutyrat (HMB), dem Metabolit von Leucin, konnte eine anabole Wirkung erzeugen (Nissen et al. 1996). Bei einer Leucingabe wird nur 5% direkt metabolisiert (van Koeving und Nissen 1992). Ob

eine direkte HMG-Gabe eine effektivere Wirkung als die Supplementierung von Leucin erzielt, ist noch offen. Hierzu fehlen große randomisierte verblindete Placebo-kontrollierte klinische Studien, um die anabole Funktion und eventuelle Nebenwirkungen einer Leucin- und / oder einer HMG-Supplementierung abschließend zu klären.

(II) Transport: Im physiologischen Zustand werden verzweigtkettige Aminosäuren, insbesondere Leucin, im Austausch mit Glutamin, über System L Transporter (L solute carriers, LAT1) in den Skelettmuskel aufgenommen. Glutamin gehört zu den neutralen Aminosäuren, welche zuvor über einen Natrium-abhängigen System A Transporter (Sodium coupled neutral amino acid transporter, SNAT2) in den Skelettmuskel gelangen (Abb. 36) (Dodd und Tee 2012). Diese System A Transporter werden durch den Einfluss von Insulin (Hyde et al. 2002) und Leucin jeweils in der Rattenmuskelzellkultur vermehrt hoch reguliert (McDowell et al. 1995). Somit kann davon ausgegangen werden, dass Leucin indirekt seine eigene Aufnahme in die Skelettmuskelzelle fördert.

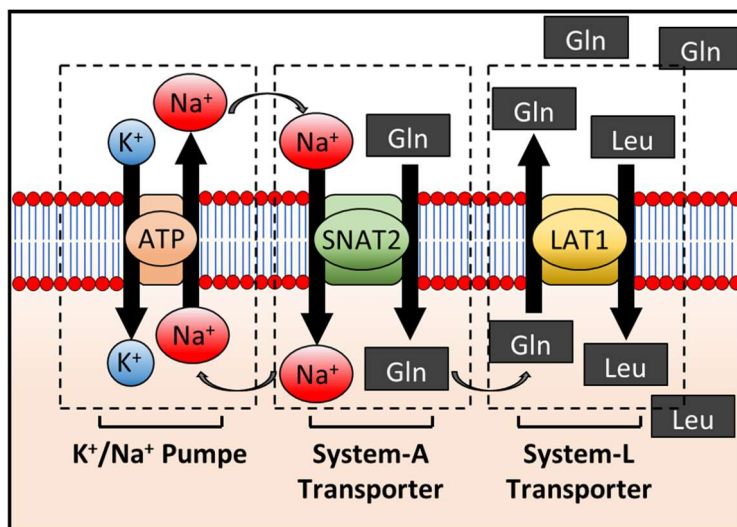


Abb. 36: Transmembranärer Transport von Glutamin und Leucin im Skelettmuskel (Modifiziert nach Dodd und Tee 2012).

In der vorliegenden Studie war *SNAT2* in der Patientengruppe mit Tumorkachexie signifikant 1,782-fach höher exprimiert als in der Patientengruppe ohne Kachexie (Tu+K- : 1,0; Tu+K+ : 1,782; $p=0,013$). *LAT1* war nur tendenziell in Tu+K+ 1,822-fach höher

exprimiert (Tu+K-: 1,0; Tu+K+: 1,822; $p=0,072$). Im Mausmodell mit Nahrungskarenz war ebenfalls das Transkriptionslevel des Glutamintransporters *Lat2* im Muskel hochreguliert (Lecker et al. 2004).

Die Expression der Transporter muss nicht die alleinige Ursache der niedrigen intrazellulären Leucinkonzentration sein. Eine verminderte Aktivität der Transporter aufgrund einer Differenz zwischen der RNA- und der Proteinebene durch posttranskriptionale Modifikation oder Regulation der Translation kann nicht ausgeschlossen werden kann.

Hack et al. (1996b) untersuchten nicht die Expression der Transporter, sondern verglichen die Aminosäurekonzentration im Blutplasma der Arteria und Vena femoralis bei Tumorpatienten ohne Gewichtsverlust mit anderen hospitalisierten Patienten. Sie beschrieben, dass es bei präkachektischen Zuständen bei Tumorpatienten zu einer verminderten Aufnahme von Glutamat in den Skelettmuskel und dadurch zu einer reduzierten Metabolisation zu Glutamin und reduzierten Abgabe dieses Metaboliten ins venöse Blut kommt. Hier könnte ebenfalls eine verminderte Aktivität des SNAT2, trotz der in der vorliegenden Studie gemessenen erhöhten Genexpression, vermutet werden.

Bergström et al. (1981) beschrieben, dass ein schweres Trauma und Sepsis mit einer erhöhten intrazellulären Natriumkonzentration einhergehen. Diese verringert den elektrochemischen Gradienten für einen Glutamintransport in die Zelle über den SNAT2 und aus der Zelle über den LAT1. Jedoch waren die Glutamin- und Glutamatkonzentration in der Skelettmuskelzelle in der vorliegenden Studie nicht verändert. Die intrazelluläre Natriumkonzentration und die Expression der Transporter wurden nicht gemessen.

Es ist jedoch auch zu berücksichtigen, dass die Aminosäuretransporter den Austausch nicht limitieren und sich die intra- und extrazelluläre Konzentration der einzelnen Aminosäuren schnell ausgleichen. Der Glutamattransporter ist hiervon ausgenommen; er ist bereits bei niedrigen Plasmakonzentrationen gesättigt (Rennie und Tipton 2000).

Letztlich ist anhand der vorliegenden Daten nicht zu klären, ob der Leucingehalt aufgrund verminderter Aktivität bei zugleich vermehrter Expression der

Aminosäuretransporter, durch geringe Bereitstellung, verringerte Plasmaspiegel oder durch einen erhöhten Umsatz von Leucin bei Tumorkachexie erniedrigt ist.

(III) Verbrauch: Eine weitere Ursache für die niedrige intrazelluläre Konzentration dieser essentiellen Aminosäure könnte ein vermehrter Aminosäureverbrauch zur Synthese von APP in der Leber (Argilés et al. 2005; Fearon et al. 2012) und ein erhöhter Bedarf des Tumors v.a. von Leucin zum Wachstum sein (Lazo 1985). Holm et al. (1995) konnten bei Patienten einen vermehrten Verbrauch der verzweigtkettigen Aminosäuren durch ein Kolonkarzinom nachweisen. Der Tumor würde zunächst die schnell verfügbaren freien Aminosäuren im Plasma und intrazellulär verbrauchen; kompensatorisch könnten diese Kompartimente durch verminderte Proteinsynthese im Muskel und Proteolyse wieder aufgefüllt werden. Eine weitere Vermutung ist, dass der Skelettmuskel von Tumorpatienten selbst vermehrt Leucin zur Energiegewinnung oxidiert (Argilés und López-Soriano 1990), da andere Energiequellen, wie Glucose und Fettsäuren, fehlen oder die Oxidationsrate von Leucin, zunächst wegen proteolytisch vermehrtem Angebot von Leucin, erhöht ist. Um der Fragestellung eines vermehrten Verbrauchs auf den Grund gehen zu können, wird zumindest die Leucinkonzentration im Plasma benötigt, die jedoch in dieser Studie hier nicht gemessen wurde.

(IV) Proteinsynthese oder Proteolyse: Der intrazelluläre Leucinmangel in den Muskelzellen könnte ein Hinweis für eine reduzierte Proteolyse sein. So korreliert in dieser Arbeit die intrazelluläre Leucinkonzentration mit der nicht signifikant unterschiedlichen Genexpression der E3-Ligase des Ubiquitinsystems *Trim63* ($r=0,682$; $B=0,466$; $p=0,005$). Bei gesteigerter Proteolyse wäre anzunehmen, dass die intrazelluläre Konzentration an freien Aminosäuren steigen würde. Es scheint jedoch aktuell keine klinische Studie (inkl. Holm et al. 2007) zu existieren, die mittels arteriovenösen Austausch-Messungen der unteren Extremität einen erhöhten Aminosäure-Efflux zeigen, welcher für eine gesteigerte Proteolyse sprechen könnte. Insbesondere ist der Efflux von 3-Methylhistidin, einem selektiven Marker des Myosinabbaus, nicht gesteigert, wenn er an der Extremität und nicht fälschlicherweise in der Ganzkörper-Bilanz gemessen wird (Lundholm et al. 1982). Insgesamt sprechen die klinischen Studien zurzeit eher für eine absolute und in Relation zur Proteolyserate

erniedrigte Proteinsynthese des Skelettmuskels. Jedoch muss dies noch abschließend geklärt werden.

Holm et al. (2007) definierten acht für den Netto-Proteinkatabolismus regulatorische Aminosäuren: Tyrosin, Serin, Histidin, Methionin, Phenylalanin, Glycin, Isoleucin und Leucin. In ihrer Studie korrelierte bei Tumorpatienten der postabsorptive Proteinkatabolismus, gemessen als Tyrosin-Austauschraten an der unteren Extremität, nicht mit der arteriellen Konzentration dieser regulatorischen Aminosäuren. In der Kontrollgruppe mit gesunden Probanden korrelierten sie invers. Holm et al. (2007) vermuteten daher, dass die Sensitivität gegenüber den regulatorischen Aminosäuren bei Tumorpatienten aufgehoben ist und somit die Regulation des Netto-Proteinkatabolismus gestört ist.

Aufgrund der im Skelettmuskel erniedrigten Leucin-Konzentration, sowie der vermuteten, gestörten Sensitivität gegenüber regulatorischen Aminosäuren, kann Leucin weder - wie es physiologisch normal wäre - die Proteinbiosynthese (Gingras et al. 2001; Kimball und Jefferson 2001; Gran und Cameron-Smith 2011; Casperson et al. 2012) und die Insulin-Sekretion (Sugden und Fuller 1991) fördern, noch die Proteolyse im Proteasom hemmen (Hamel et al. 2003) oder die Insulin-Sensitivität (Gannon und Vaughan 2016) verbessern. Somit werden die anabolen Funktionen von Leucin und Insulin bei Tumorkachexie abgeschwächt (Atherton et al. 2016).

Zusammenfassend kommt der hier erstmals im humanen kachektischen Skelettmuskel aufgezeigte Leucinmangel als ein wesentlicher Faktor der multifaktoriell bedingten Tumorkachexie und eventuell als früher Marker dieser in Frage, da er offenbar vor einer signifikanten, histomorphologischen Muskelzellhypotrophie auftritt. Ein Therapieansatz, der den Leucinmangel im Skelettmuskel beheben kann, erscheint deshalb sinnvoll.

4.3.2. Isoleucin und Valin

Isoleucin hat eine ähnliche, wenn auch schwächere, regulatorische und anabole Funktion wie Leucin (Holm et al. 2007). In der vorliegenden Studie zeigte Isoleucin bei

Tumorkachexie eine tendenziell niedrigere Konzentration im Skelettmuskel (Tu+K-: 0,95 nmol/mg; Tu+K+: 0,93 nmol/mg; $p=0,099$). Es kann deshalb vermutet werden, dass die anabole Wirkung auf den Skelettmuskel somit zusätzlich reduziert ist.

Für die Valinkonzentration ergab sich kein nachweisbarer Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen. Es gibt bisher keine Studie, in welcher diese Aminosäuren einzeln auf ihre intrazelluläre Konzentration im Skelettmuskel oder auf ihren Effekt bzgl. Tumorkachexie hin untersucht wurden.

4.3.3. Threonin

Threonin ist eine weitere essentielle proteinogene Aminosäure, deren intrazelluläre Konzentration bei Patienten mit Tumorkachexie gegenüber Tumorpatienten ohne Gewichtsverlust um 22% signifikant geringer war (Tu+K+: 4,38 nmol/mg; Tu+K-: 5,58nmol/mg; $p=0,003$). Auch dies wurde bisher in keiner Studie untersucht. Dabei ist nur wenig über die Funktion von Threonin im Muskel bekannt, was eine Hypothese zur Ursache und Wirkung einer Erniedrigung der Konzentration von Threonin unter Kachexie begründen könnte.

4.3.4. Aspartat

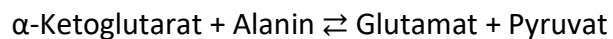
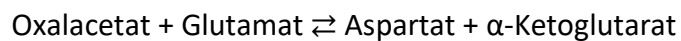
Die Aspartat-Konzentration war in der vorliegenden Studie bei Patienten mit Tumorkachexie im Skelettmuskel signifikant um 43% höher als bei Patienten ohne Kachexie konzentriert (Tu+K-: 6,56nmol/mg; Tu+K+: 9,41nmol/mg; $p=0,015$).

Zusammen mit Glutamat hemmt Aspartat die Zellproliferation von Tumorzellen durch eine geringere Phosphorylierung von Akt (Yamaguchi et al. 2016). Studien zur Frage, ob erhöhtes intrazelluläres Aspartat sowohl die Proteinsynthese hemmt, als auch die Proteolyse fördert und somit neben einem erniedrigten intrazellulären Leucin und Isoleucin zur Kachexie beiträgt, liegen nicht vor.

Über die Ursache des im Gegensatz zu Leucin und Glutamat erhöhten Aspartatspiegels, kann nur spekuliert werden:

Ein hohes Aspartatlevel könnte u.a. durch erhöhte Proteolyse, welche jedoch aufgrund des nicht gesteigerten Effluxes von 3-Methylhistidin (Lundholm et al. 1982) unwahrscheinlich ist, oder erhöhten Transport in den Skelettmuskel entstehen.

Eine vermehrte Umsetzung von Oxalacetat und Glutamat durch die Aspartat-Aminotransferase kann zu einer hohen Aspartat- und α -Ketoglutaratkonzentration führen. α -Ketoglutarat reagiert mit Alanin über die Alanin-Aminotransferase zu Glutamat und Pyruvat. Glutamat wird freigesetzt und von der Leber weiter verstoffwechselt.



Die vorliegenden Studienergebnisse einer bei Tumorkachexie unveränderten intrazellulären Alanin- und nicht signifikant intrazellulär erhöhten Glutamatkonzentration (Tu+K-: 4,03nmol/mg; Tu+K+: 5,81nmol/mg; p=0,103) schließen dabei einen vermehrten Anfall von Aspartat nicht prinzipiell aus, da es durch eine schnelle weitere Umsetzung oder durch den direkten Transport ins Blut konstant gehalten werden könnte. Studien mit parallelen Messungen der intrazellulären und Plasmakonzentration der Aminosäuren wären hier weiterführend.

4.3.5. Glutathion-Vorläufer: Glycin, Glutaminsäure und Cystein

Als wichtiges intrazelluläres Antioxidans des Skelettmuskels wird Glutathion als Tripeptid aus Glycin, Glutaminsäure und Cystein synthetisiert. Es wird angenommen, dass ein Glutathionmangel im Skelettmuskel die Entzündung und den oxidativen Stress bei Kachexie begünstigt (Otis et al. 2007; Mueller et al. 2014) und eine Therapie mit Antioxidantien der Entzündung und Kachexie effektiv entgegenwirkt (Mantovani et al. 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurde bei Patienten mit Tumorkachexie ein signifikant verringerter intrazellulärer Glycinspiegel festgestellt (Tu+K-: 11,86nmol/mg; Tu+K+: 10,19nmol/mg; p=0,045), während Glutaminsäure und Cystin keine signifikanten intrazellulären Konzentrationsveränderungen zeigten. Cystein entsteht nach Oxidation

der Sulfhydrylgruppe und Bildung von Disulfidbrücken zwischen zwei Cystinresten. Die Cysteinkonzentration im Skelettmuskel wurde nicht gemessen. Es könnte vermutet werden, dass das niedrige Glycinlevel ausreicht limitierend auf die Glutathionsynthese zu wirken.

Ham et al. (2016) postulierten im Mausmodell, dass durch Glycin die entzündungsassoziierte Resistenz gegenüber Leucin im Skelettmuskel aufgehoben werden kann. Der in der vorliegenden Arbeit bei Tumorkachexie nachgewiesene signifikant verringerte intrazelluläre Glycinspiegel würde somit eine wie zuvor diskutierte Leucinresistenz nicht aufheben oder abschwächen können.

In einem Mausmodell zur Alkohol-bedingten Myopathie konnte gezeigt werden, dass durch Cysteinsupplementierung und damit vermehrter Glutathionbildung, die Proteine weniger oxidiert werden und das Fbxo32-Level sinkt (Otis et al. 2007).

Glutathion selbst wurde in dieser Studie nicht untersucht. Jedoch wurde die Expression der *Gamma-Glutamylcystein Synthetase (GCS)*, welche den ersten Schritt der Glutathionsynthese katalysiert, in der vorliegenden Studie untersucht. Sie war in der Patientengruppe mit Kachexie signifikant geringer exprimiert (Tu+K-: 1,0; Tu+K+: 0,831; $p=0,036$). Ebenfalls war die Expression der *Glutathion-Disulfid Reduktase (GSR)*, welche oxidiertes Glutathion wieder reduziert, signifikant reduziert, zu messen (Tu+K-: 1,0; Tu+K+: 0,657; $p=0,026$). Übereinstimmend wurde im Tumor-Mausmodell in Muskelfasern des Typ IIa des M. vastus lateralis, sowie im Muskelfasern des Typs 2b des M. vastus lateralis und des M. gastrocnemius signifikant weniger Glutathion gemessen (Hack et al. 1996a). Ebenso war das Level an reduziertem und Gesamt-Glutathion im M. rect. abd. bei kachektischen Tumorpatienten verringert (Schmitt et al. 2007a).

Zusammenfassend ist anzunehmen, dass es im Skelettmuskel bei Tumorkachexie aufgrund des Glycinmangels, der reduzierten Expression der GCS und der GSR ein Mangel des Antioxidans Glutathion resultiert. Aufgrund des verringerten Gehalts an Glutathion kann der oxidative Stress bei Tumorkachexie nicht entsprechend reduziert werden. Verstärkend kommt der Glycinmangel hinzu, wodurch die dieser Aminosäure zugeschriebene zellschützende und immunmodulierende Wirkung nur eingeschränkt entfalten kann (Zhong et al. 2003).

4.3.6. Carnosin-Vorläufer: Histidin und β -Alanin

Histidin und β -Alanin sind die Vorläuferaminosäuren des Dipeptids Carnosin, welches freie Sauerstoffradikale binden kann. Es wurde keine signifikant unterschiedliche intrazelluläre Carnosinkonzentration bei kachektischen gegenüber nicht kachektischen Tumorpatienten gemessen (Tu+K-: 38,87nmol/mg; Tu+K+: 38,93nmol/mg; $p=0,496$). Die Histidin-Konzentration war im Skelettmuskel der kachektischen Tumorpatienten signifikant höher als bei nicht-kachektischen Tumorpatienten (Tu+K-: 2,91nmol/mg; Tu+K+: 3,47nmol/mg; $p=0,034$). Die β -Alanin-Konzentration lag unter der Nachweisgrenze. Demgegenüber beschrieben Schmitt et al. (2007a) in ihrem Abstract bei einem vergleichbaren Kollektiv von Patienten, aber kleinerer Anzahl von Proben, eine intrazellulär signifikant verminderte Carnosinkonzentration bei Tumorkachexie, sowie eine nicht signifikant veränderte intrazelluläre Konzentration von β -Alanin und Histidin. Über die Rolle dieses Antioxidans in der Entwicklung der Kachexie kann aktuell nur spekuliert werden.

4.4. Genexpression anhand qRT-PCR und Protein-Array

4.4.1. Apoptose

Oxidativer Stress spielt eine große Rolle bei Tumorkachexie (Mueller et al. 2014). Koolman und Röhm (2009, S. 448) beschreiben, dass der intrinsische Weg der Apoptose durch oxidativen Stress ausgelöst wird und das Verhältnis von BAX und BCL2 in Richtung Apoptose verschiebt. In der vorliegenden Studie konnte entsprechend gezeigt werden, dass die Expression des antiapoptotischen Gens *BCL2* im Skelettmuskel bei Tumorkachexie signifikant (Tu+K-: 1,0; Tu+K+: 0,488; $p=0,028$) geringer ist und das proapoptotische Gen *BAX* zwar nicht vermehrt, aber zumindest gleichbleibend ($p=0,309$) exprimiert wird. Die *CASP3*-Expression unterschied sich ebenfalls nicht signifikant zwischen den beiden Patientengruppen. Der Fas-Ligand, welcher durch Bindung an seinen Rezeptor die Apoptose einleitet, wies jedoch im Protein-Array bereits eine um 2,32-fach stärkere Expression bei Patienten mit Tumorkachexie gegenüber den Tumorpatienten ohne Gewichtsverlust auf.

Bossola et al. (2006) untersuchten Muskelbiopsien des M. rect. abd. von 16 Patienten mit Magenkarzinom mit im Durchschnitt 6% Gewichtsverlust und von 5 Patienten, die aufgrund einer benignen Erkrankung operiert wurden. In ihrer Studie zeigte sich im Western-Blot der Poly-ADP-Ribosyl Polymerase, die ein Substrat der *CASP3* ist und deren vermehrter Abbau somit ein indirekter Hinweis für eine erhöhte *CASP3* Aktivität ist, auch kein gesteigerter Abbau. Mit der TUNEL-Technik konnten sie außerdem keine vermehrte Apoptose im M. rect. abd. der kachektischen Tumorpatienten finden (1,4-1,5% apoptotische Zellkerne). Ca. 2% apoptotische Zellen in adulten Muskelzellen sind physiologisch. Bossola et al. (2006) vermuteten, dass Apoptose eher in späteren Stadien des Gewichtsverlusts morphologisch sichtbar wird.

Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von Busquets et al. (2007): Sie untersuchten Patienten mit Magen-Darm-Tumoren und einem Gewichtsverlust von ca. 5% im Vergleich zu Kontrollpatienten, die eine benigne Operationsindikation hatten. In der Gruppe mit Tumorkachexie konnten sie eine dreifach erhöhte DNA-Fragmentierung als Hinweis auf vermehrt stattfindende Apoptose im Skelettmuskel nachweisen.

Der Unterschied zwischen diesen wenigen klinischen Studien könnte durch verschiedene Tumorarten und –stadien und hierbei unterschiedliche Muskelatrophieraten verursacht sein, abgesehen von einer kleinen Anzahl Probanden, unterschiedlichen Gewichtsverlustgrenzen u.v.m.

Im Kaninchenmodell zur Kachexie mit implantierten VX2-Karzinomzellen wurden andere Ergebnisse beobachtet: Im frühen Tumorstadium zeigte sich im Skelettmuskel eine vermehrte *Bax*-Expression, welche im späteren Tumorstadium nicht mehr nachweisbar war (Yoshida et al. 2001).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie sind somit weder einzuordnen noch eindeutig. Sie lassen eher vermuten, dass sich das Gleichgewicht der BCL-Protein-Familie als Reaktion auf die Tumorkachexie beim Menschen bereits frühzeitig in Richtung Apoptose verschiebt. Jedoch eventuell erst im Spätstadium der Tumorkachexie die Apoptose fördernden Gene exprimiert und entsprechende Proteine gebildet werden. Dies könnte darauf hinweisen, dass im Früh- und Spätstadium der Kachexie unterschiedliche Signalwege dominieren. Deshalb sind umfangreichere klinische Studien für verlässliche Daten mit Zuordnung zu verschiedenen Stadien der Kachexieentwicklung jeweils für relevante Tumorentitäten dringend nötig.

4.4.2. Proteosomale Aktivität

Im vorliegenden Vergleich von Tumorpatienten mit und ohne Kachexie waren die zwei muskelspezifischen E3-Ligasen des Ubiquitinsystems *TRIM63* und *FBXO32* bei Tumorkachexie, im Gegensatz zu tierexperimentellen Daten (Maus) von Kamei et al. (2004), nicht höher exprimiert. Auch im Vergleich von Tumorpatienten (unter 5% Gewichtsverlust) mit Patienten, die einer Cholezystektomie unterzogen wurden, zeigte sich kein Unterschied in der Expression der beiden E3-Ligasen im M. rect. abd. (Smith et al. 2011). Stephens et al. (2010) konnten im Skelettmuskel von Patienten mit durchschnittlich 9% Gewichtsverlust ebenso keinen Unterschied in der Expression dieser Ligasen zu Tumor-freien Patienten zeigen. Auch die Expressionsstärke des Foxo3-hemmenden *PPARGC1A* war zwischen den untersuchten Gruppen in der vorliegenden Studie nicht unterschiedlich.

Die vorliegenden Daten weisen eher in Richtung einer verminderten Proteinsynthese, u.a. aufgrund des Leucinmagels (wie bereits in Kapitel 4.3.1 diskutiert), als in Richtung einer verstärkten Proteolyse. Die Rolle anderer involvierter Signalwege der Proteolyse, z.B. einer erhöhte Calpain-Aktivität (Smith et al. 2011), wurden hier nicht untersucht.

Matrix-Metallopeptidasen sind Enzyme, welche die extrazelluläre Matrix degradieren (Devine et al. 2015). Die Konzentration von MMP9 war im Protein-Array des M. rect. abd. bei Tu+K+ 1,39-fach höher als in Tu+K-. Die Genexpression der *MMP9* unterschied sich jedoch auf RNA-Ebene nicht zwischen beiden Gruppen. Eine Regulation auf RNA-Ebene könnte die Diskrepanz zwischen RNA- und Protein-Level erklären.

Im Rattenmodell konnte eine Therapie mit IL15 die ATP-Ubiquitin abhängige Proteolyse des Muskels bei Tumorkachexie teilweise aufheben (Carbo et al. 2000). IL15 zeigte zudem in der Zellkultur antikachektische Eigenschaften, denn das Interleukin stellt einen anabolen Faktor im Skelettmuskel dar, welcher die Muskelzelldifferenzierung und MHC-Bildung fördert (Quinn et al. 1995). Im Protein-Array war die Expression von IL15 bei Tumorkachexie 1,40-fach höher als bei den nicht kachektischen Tumorpatienten. Ob die oben genannten antikachektischen Funktionen von IL15 auf den Menschen übertragbar sind und dies die nicht vorhandene Muskelatrophie erklären kann, bleibt unklar.

4.4.3. Myogenese

Der NOTCH-Signalweg ist nicht nur an der Angiogenese sondern auch an der Proliferation und Aktivierung von Satellitenzellen beteiligt (Conboy und Rando 2005). Auf RNA-Ebene war die Genexpression von *NOTCH2* zwischen beiden Gruppen nicht unterschiedlich (*NOTCH1* war im Skelettmuskel nicht nachweisbar). Im Protein-Array war NOTCH1/2 nicht enthalten.

Die Genexpression von *PAX7*, welches dem dem NFκB-Signalweg unterliegt und die myogene Differenzierung, sowie die Regeneration der Muskeln hemmen kann (He et al. 2013), war ebenfalls zwischen beiden Gruppen nicht unterschiedlich.

Pessina et al. (2010) untersuchten die Expression von *PAX7* und *MyoD* im M. rect. abd. bei Patienten mit Magenkarzinom in verschiedenen Stadien und gesunden Kontrollen.

In ihrer Studie war PAX7 bei allen Tumorpatienten signifikant höher exprimiert als in der Kontrollgruppe. MyoD hingegen war nur in den frühen Magenkarzinomstadien höher exprimiert als in der Kontrollgruppe.

Bei Tumorkachexie scheint eine Hochregulierung von *MYOD*, als Signal für eine erhöhte Muskelregeneration, zumindest in den frühen Tumorstadien dem Muskelabbau entgegen zu wirken. Dies ist jedoch offenbar nicht ausreichend, um 10% Gewichtsverlust der Tumorpatienten zu kompensieren.

Serpin family E member 1 (SERPINE1; Synonym: Plasminogen activator inhibitor Type I) ist ein Proteaseinhibitor, welches von Adipozyten, Endothelzellen und Stromazellen gebildet wird. Es ist im Tumorwachstum, -invasion und Metastasierung involviert. Außerdem scheint SERPINE1 eine Rolle in der Muskelregeneration zu spielen: Serpine1-knockout Mäuse zeigten eine verbesserte Regeneration von geschädigter Muskulatur (Koh et al. 2005). Es wurde bereits beobachtet, dass die Expression von SERPINE1 bei Tumorkachexie im Mausmodell erhöht ist (Jacobi et al. 2011).

In Tu+K+ betrug die Proteinexpression von SERPINE-1 das 0,78-fache der Tu+K- Kontrolle, war jedoch in Tu+K-/+ 1,42-fach höher als in Tu+K-. Dies könnte eine transient höhere Expression im frühen Tumor- oder Kachexiestadium widerspiegeln. Sollten die vermehrt gefundenen zentralisierten Zellkerne durch gesteigerte Myogenese mitbedingt sein, so sind diese Ergebnisse mit den Daten aus dem Protein-Array vereinbar.

4.4.4. Inflammation

Zur vereinfachten Übersicht sei hier zunächst eine tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse der pro- und antiinflammatorischen Mediatoren vorangestellt (Tab. 8).

Tab. 8: Zusammenfassende Darstellung der pro- und antiinflammatorischen Mediatoren.

↑ (x-fach) = Erhöhung um das x-fache in Tu+K+ gegenüber Tu+K-.

↔ = Keine Veränderung; - = nicht untersucht.

Bzgl. PCR-Ergebnisse: t=T-Test; *p<0,05.

Proinflammatorische Mediatoren		Antiinflammatorische Mediatoren	
PCR	Protein-Array	PCR	Protein-Array
-	TNFSF13B ↔	-	IL4 ↔
CD68 ↑ * (1,48-fach)	-	-	IL10 ↑ (1,33-fach)
-	CRP ↑ (1,55-fach)	-	IL13 ↑ (1,57-fach)
-	EGF ↑ (1,89-fach)	SOCS3↔	-
GDF 15 ↔	GDF15 ↑ (1,39-fach)		
-	IFNG ↑ (1,14-fach)		
IL1β ↔	IL1β ↑ (1,41-fach)		
IL6 ↔	IL6 ↑ (1,50-fach)		
IL8 ↔	IL8 ↑ (1,48-fach)		
-	IL32 ↑ (3,03-fach)		
PTGS2↔	-		
TNF↔	TNF ↑ (187-fach)		

CD68 ist hoch exprimiert auf humanen Gewebsmakrophagen und Monozyten (Holness und Simmons 1993) und kann als Marker der Makrophageninfiltration gesehen werden. In der vorliegenden Studie wurde auf RNA-Ebene eine signifikant erhöhte Expression

von *CD68* im Skelettmuskel bei kachektischen Tumorpatienten gegenüber Patienten ohne Gewichtsverlust gefunden (Tu+K-: 1,0; Tu+K+: 1,483; $p=0,040$). *CD68* wurde jedoch nicht in den Gewebeschnitten selbst immunlokalisiert, daher kann keine Aussage über die Lokalisation von *CD68* bzw. von Makrophagen gemacht werden. Bislang fehlen in der Literatur entsprechende Untersuchungen an Humangewebe.

Batista et al. (2016) konnten im Lebergewebe von Tumorpatienten vermehrt *CD68* positive Makrophagen und zusätzlich eine erhöhte Expression von *CD68* im Fettgewebe von kachektischen Tumorpatienten gegenüber der gesunden Kontrollgruppe zeigen. Martignoni (1994) zählte auch vermehrt *CD68* positive Makrophagen in Leberbiopsien von kachektischen im Vergleich zu nicht-kachektischen Patienten mit Pankreaskarzinom. Diese Ergebnisse sind ein Hinweis auf eine systemische Makrophageninvasion. Die PCR-Ergebnisse der vorliegenden Studie deuten auf entsprechende Geschehnisse im M. rect. abd. bei Tu+K+ im Vergleich zu Tu+K- hin.

Die Aufgabe von Makrophagen ist neben der Phagozytose (z.B. apoptotischer Zellen) u.a. die Sekretion von Zytokinen. Daher ist anzunehmen, dass bei Tumorkachexie eine erhöhte Makrophageninvasion zu vermehrter Interleukinausschüttung führt. Die systemische Entzündung ist schon lange ein gemeinsamer Faktor verschiedener Kachexiedefinitionen (Argilés et al. 2014), daher wurden Interleukine, insbesondere IL6, schon eingehender erforscht und auch als Biomarker der Tumorkachexie definiert (Argilés et al. 1992). Martignoni (1994) fand entsprechend, dass die in der Leber von kachektischen im Vergleich zu nicht-kachektischen Patienten mit Pankreaskarzinom vermehrt vorkommenden *CD68* positiven Makrophagen mit einer signifikant erhöhten Anzahl von IL1 und IL6 positiven Zellen in der Leber assoziiert sind. Ob diese Ergebnisse auf den Muskel übertragbar sind, bleibt anhand unserer Ergebnisse bislang unklar.

Auch im Protein-Array der vorliegenden Studie zeigte sich bei Patienten mit Tumorkachexie eine vermehrte Expression entzündungsassoziierter Mediatoren gegenüber den Tumorpatienten ohne Gewichtsverlust: IL1 β (1,41-fach), IL6 (1,50-fach), IL8 (1,48-fach), TNF (1,87-fach), IFNG (1,14-fach), systemische Entzündungsmarker CRP (1,55-fach) und IL32 (3,03-fach). Diese Befunde weisen darauf hin, dass bei Tumorkachexie auch im Muskel ein erhöhtes Entzündungslevel vorherrschen könnte. In

der PCR hingegen zeigte sich lediglich eine Tendenz, jedoch keine signifikant erhöhten mRNA-Level von *IL1 β* (Tu+K+: 2,406-fach; p=0,093), *IL6* (Tu+K+: 4,408-fach; p=0,350), *IL8* (Tu+K+: 10-fach; p=0,386) und *TNF* (Tu+K+: 2,799-fach; p=0,310) im M. rect. abd. *CRP* und *IL32*, dessen Funktionen bisher kaum beschrieben sind, wurden in der PCR nicht analysiert.

Die Differenz zwischen Genexpression und Proteinkonzentration der Interleukine sowie der Zytokine könnte durch unterschiedliche Regulationsmechanismen verursacht sein. Gene können transkriptionell, post-transkriptionell und vielfältig translationell, durch Stabilitätseigenschaften von mRNA und Proteinen, sowie über positives oder negatives Feedback reguliert werden (Löffler et al. 2007, S. 441, 598, 656). Da die Regulation von Genexpression und Proteinkonzentration zeitlich deutlich verschieden sein kann, müssen sie sich nicht kongruent verhalten. Bei einem erhöhten Entzündungslevel kann es z.B. auch zu einer vermehrten Feedback-Hemmung der Zytokine kommen. Als Gegenspieler der Entzündung wirken z.B. die Interleukine 4 und 10, und sind damit antikachektisch (Argilés und Lopez-Soriano 1999; Argilés et al. 2007). Das Proteinlevel von IL4 im M. rect. abd. war bei 5-10% Gewichtsverlust 1,27-fach erhöht, jedoch bei über 10% Gewichtsverlust nicht weiter gesteigert. IL13, welches dem IL4 sehr ähnlich ist, war in Tu+K+ 1,57-fach erhöht gegenüber Tu+K-. IL10 war auf der Proteinebene bei Kachexie gegenüber Tu+K- 1,33-fach erhöht. Damit war das relative Proteinlevel der anti-inflammatorischen Interleukine in der Summe geringer erhöht als das der pro-inflammatorischen Interleukine. Die Genexpression der Interleukine *IL4*, *IL10* und *IL13* wurden nicht untersucht.

SOCS3 ist ein weiterer effektiver Inhibitor der andauernden Zytokinsignaltransduktion, auch wenn *SOCS3* nur kurzfristig in die Signalweiterleitung eingreift (Löffler et al. 2007, S. 441). Das mRNA-Level von *SOCS3* war im M. rect. abd. jedoch im Vergleich der beiden Patientengruppen nicht verändert. Im verwendeten Protein-Array war *SOCS3* nicht enthalten. Allerdings wurde tierexperimentell bei kachektischen Mäusen mit implantierten Kolontumorzellen ein höheres *Socs3*-Level gefunden als bei Mäusen ohne Tumor (Bonetto et al. 2011). SOCS Proteine sind zwar früh nach Zytokinstimulation bereits nachweisbar, haben aber zumeist nur eine geringe Halbwertszeit, da sie schnell durch das Proteasom abgebaut werden. Es lässt sich daher vermuten, dass eine etwaige

anti-inflammatorische Gegenregulation bereits im Frühstadium der Tumorkachexie nicht ausreicht, bzw. bereits frühzeitig abgeschlossen ist.

TNFSF13B wirkt über den NFκB-Signalweg, fördert die Expression von proinflammatorischen Zytokinen und damit die Entwicklung der Kachexie (Rihacek et al. 2015). TNFSF13B könnte ein weiterer Marker der Tumorkachexie sein, da es im M. rect. abd. 1,78-fach bei Tu+K+ gegenüber Tu+K- erhöht war. Des Weiteren könnte TNFSF13B ein Mitverursacher der bei Tumorkachexie vorherrschenden Insulinresistenz sein, da im Mausmodell bei erhöhtem TNFSF13B -Level eine Insulinresistenz ähnlich einem Diabetes mellitus Typ 2 festgestellt werden konnte (Hamada et al. 2011). In selbiger Studie konnte auch ein erhöhtes TNF- und IL6 -Level gezeigt werden.

Entzündungsmediatoren fördern die Bildung von PTGS2 (Syn.: COX2) durch Makrophagen. PTGS2 könnte über die Bildung von Prostaglandinen die Inflammation und somit auch die Kachexie aufrecht halten. In einigen Studien wurde daher die Wirksamkeit von COX2-Hemmern bei Tumorkachexie teilweise erfolgreich getestet (Davis et al. 2004). Jedoch war in der vorliegenden Studie *PTGS2* in beiden Gruppen nicht unterschiedlich exprimiert.

EGF und GDF15 im Plasma von Tumorpatienten mit Kachexie sind mit Entzündung bzw. Gewichtsverlust und geringer Überlebenszeit assoziiert (Lerner et al. 2015). In der vorliegenden Studie war das EGF-Proteinlevel im M. rect. abd. bei Tu+K+ 1,89-fach und von GDF15 1,39-fach höher als bei Tu+K-. In der PCR wurde EGF nicht untersucht. Durch eine Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren des EGF-Rezeptors kann zumindest bei nicht kleinzelligem Lungenkarzinom das Entzündungslevel gesenkt werden (Umekawa et al. 2013). Das mRNA-Level von *GDF15* war nicht signifikant in Tu+K+ gegenüber Tu+K- erhöht (Tu+K+: 1,503; p=0,455).

Im Rahmen der mit Kachexie assoziierten Entzündung scheinen mehrere Regulationskreisläufe ineinander zu greifen, die bisher noch nicht vollständig verstanden werden. Dennoch weisen oben genannte Ergebnisse möglicherweise darauf hin, dass Studien zu entzündungshemmenden Therapien vermutlich vielversprechende Ergebnisse liefern könnten. Unterstützend muss zeitnah am weiteren Verständnis der molekularen Grundlagen geforscht werden.

4.4.1. MAOA und MAOB

Bei Patienten mit Tumorkachexie war im M. rect. abd. *MAOA* auf RNA-Ebene signifikant geringer exprimiert als bei Tumorpatienten ohne Gewichtsverlust (Tu+K-: 1,0; Tu+K+: 0,188; $p=0,03$). *MAOB* war hingegen bei Tumorkachexie signifikant höher exprimiert (Tu+K-: 1,0; Tu+K+: 1,403; $p=0,047$).

Bei einer Untersuchung von gesunden Versuchspersonen zeigte sich bei einer erhöhten *MAOA* Expression im Skelettmuskel zugleich ein vermehrter Körperfettanteil (Mason et al. 2011). In der vorliegenden Studie wurde ebenfalls in der Tumorpatientengruppe ohne Kachexie (und somit in der schwereren Gruppe, auch wenn nicht nur der Körperfettanteil höher ist) eine signifikant höhere *MAOA* Expression gemessen. Elgzyri et al. (2012) und Christensen (1970) beobachteten, dass bei einer reduzierten *MAOA* Expression die Plasmakonzentration von Katecholaminen bei Verwandten des ersten Grades von Patienten mit Diabetes Typ 2 erhöht ist. Dabei ist anzunehmen, dass vermehrtes Adrenalin die Insulinsekretion und periphere Glukoseaufnahme hemmt (Schmidt und Lang 2007, S. 477). Die bei Tumorkachexie beschriebene Insulinresistenz (s. Kap. 1.8; S. 22), konnte auch in der vorliegenden Studie gezeigt werden: Die Diagnoserate einer diabetogenen Stoffwechsellage, bei der es sich auch um einen pankreopriven Diabetes handeln könnte, war in der Patientengruppe mit Tumorkachexie signifikant höher (Tab. 5; S. 75). Deshalb sollte untersucht werden, ob ein erniedrigtes *MAOA*-Level, neben einem Hinweis für einen Diabetes mellitus Typ 2, auch ein neuer Marker für die Tumorkachexie sein könnte.

MAOB kommt physiologisch nur in geringer Konzentration im Skelettmuskel vor (Grimsby et al. 1990). Der unerwartete Befund, dass *MAOB* im Gegensatz zur *MAOA* bei Tumorkachexie vermehrt exprimiert war, konnte mangels publizierter Studien nicht eingeordnet werden. Es ist jedoch davon auszugehen, dass mit dem erhöhten Level an *MAOB* auch vermehrt Abbauprodukte, u.a. das aggressive Oxidationsmittel Wasserstoffperoxid, entsteht. So zeigen Zellkulturstudien mit humanen Myozyten, dass zumindest, wenn *MAOA* unter Dexamethasontherapie stark hoch reguliert ist, entsprechend viel Wasserstoffperoxid produziert wird (Manoli et al. 2005). Auf *MAOB* müsste diese Erkenntnis übertragbar sein. Der Anstieg von Wasserstoffperoxid im

Gewebe durch ein erhöhtes MAOB-Level bei Tumorkachexie könnte somit ein Mitverursacher der Entzündung, sowie des Skelettmuskelschadens und -untergangs sein.

4.4.2. Angiogenese

Die vorliegenden Genexpressionsanalysen des M. rect abd. auf RNA-Ebene hat keine vermehrten Angiogenese-Signale bezüglich der drei Gene *VEGFA*, *VEGFB* und des Rezeptors *KDR* gezeigt. Jedoch konnte mit dem Protein-Array eine 1,30-fach stärkere Proteinexpression von VEGF bei Tu+K+ gegenüber Tu+K- gemessen werden.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass PF4, welches physiologisch die Angiogenese hemmt, im Protein-Array bei Kachexie gegenüber Tumorpatienten ohne Gewichtsverlust 0,16-fach supprimiert ist. Unterstützend kommt hinzu, dass im Protein-Array eine starke Erhöhung 2,07-fach von Angiopoietin-1 (ANGPT1) und eine 1,77-fache Erhöhung von Angiopoietin-2 (ANGPT2) bei Tumorkachexie gegenüber Tu+K- zu messen war. Dies wurde in Kachexiemodellen bisher nicht dezidiert untersucht. Auf Grund dieser Befunde und des histologischen Ergebnisses von tendenziell (bei kleiner N-Zahl) erhöhten Kapillarkontakten (s. Kap. 3.2.5) kann von einer pro-angiogenetische Tendenz im Skelettmuskel bei Tumorkachexie ausgegangen werden. Vor dem Hintergrund einer inflammatorischen Infiltration und Zytokinexpression sollten diese Befunde als Hinweis für eine frühe „myositische Phase“ der Kachexie weiterverfolgt werden.

Im Mausmodell zu verletzten Skelettmuskeln konnte gezeigt werden, dass ANGPT1 und in schwächerem Umfang ANGPT2, nicht nur Entwicklung und Erhalt der Blutgefäße, sondern in vivo auch die Regeneration von kontraktile Muskelfasern verstärken und in vitro das Überleben, Migration und Differenzierung von Skelettmuskelvorläuferzellen stimulieren (Mofarrahi et al. 2015). Eventuell ist das erhöhte Proteinlevel von ANGPT1 und 2 ursächlich für die in der Histologie der vorliegenden Studie beobachteten vermehrt auftretenden, zentralisierten Zellkerne und somit Regeneration der Skelettmuskelfasern, sowie die tendenziell vermehrten Kapillarkontakte.

Somit sollte der Zusammenhang zwischen Tumorkachexie und der Expression von *ANGPT1* und 2 in zukünftigen Untersuchungen ein Ziel darstellen, da sie zugleich Muskel- und Gefäßwachstum zu beeinflussen scheinen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Das komplexe Syndrom der Tumor-assoziierten Kachexie, ein ungewollter Verlust an Muskel- (und Fett-) Masse, stellt eine onkologische Herausforderung dar: Es mindert die Lebensqualität und kann zum Verlust von Mobilität und z.B. über eine Insuffizienz der Atemmuskulatur schließlich zum Tod führen. 20% aller Karzinompatienten versterben an der Tumorkachexie, dennoch ist sie weder befriedigend mechanistisch aufgeklärt noch therapeutisch gezielt beeinflussbar. Studien an humanen Gewebeproben, insbesondere an der Skelettmuskulatur, sind im Gegensatz zu solchen an Zellkulturen und Tiermodellen rar und noch wenig eindeutig. Das Pankreaskarzinom stellt als Malignom mit der massivsten und raschesten Kachexieentwicklung das klinisch eindrücklichste Beispiel dar. Ziel dieser Arbeit war es daher, in Skelettmuskelbiopsien von Patienten mit Pankreaskarzinom zum Zeitpunkt der ersten Operation, Kachexie-assoziierte Veränderungen der Muskelfaser-Morphometrie, der Konzentration metabolisch wichtiger Aminosäuren, sowie der Expression pro-inflammatorischer, -angiogenetischer, -atrophischer und -apoptotischer Signale auf RNA- und Proteinebene zu untersuchen. Hierzu dienten intraoperativ gewonnene Skelettmuskelbiopsien des Musculus rectus abdominis von 36 Patienten mit histologisch bestätigtem duktalem Pankreaskarzinom. Die Patienten-Gruppe mit Kachexie (N=16) wurde mit derjenigen ohne Kachexie (N=22, Kontrollgruppe) verglichen, wobei Kachexie definiert wurde als ungewollte Gewichtsabnahme von mindestens 10% innerhalb der letzten 6 Monate. In Kryoschnitten der Muskelbiopsien wurden mittels ATPase-Färbung die Muskelfasergröße, -dichte, -komposition, mittels CD31-Färbung die Kapillarkontakte und mittels Hämalaun-Färbung die zentralisierten Zellkerne erfasst. Darüber hinaus wurde die Konzentration von 26 intrazellulären Aminosäuren mittels HPLC bestimmt und die relative Expression von 29 Genen via qRT-PCR sowie 102 Gene auf Proteinebene in Probenpools mittels Protein-Array untersucht.

Entgegen der Erwartung konnte bei Kachexie im Vergleich zur Kontrolle keine signifikante Abnahme der Muskelfasergröße (bzw. Zunahme der -dichte) im Sinne einer Atrophie beobachtet werden. Eine Kachexie-assoziierte Hochregulierung muskelspezifischen E3-Ligasen des Ubiquitinsystems *TRIM63* und *FBXO32* als Proteolyse-Marker fehlten ebenso wie eine signifikant erhöhte Expression der pro-apoptotischen Signale *BAX* und *CASP3*. Jedoch konnte eine 2,32-fach erhöhte Protein-Expression des Fas-Liganden, sowie eine signifikant geringere RNA-Expression des antiapoptotischen *BCL2* (0,49-fach, $p=0,028$) gemessen werden. Ein insgesamt um 5% ($p=0,085$) und innerhalb des Muskelfasertyps I um 7% signifikant ($p=0,031$) erhöhter Faseranteil mit zentralisierten Zellkernen könnte dabei auf eine gesteigerte Muskelregeneration

hinweisen ohne mit erhöhter *PAX7*-Expression assoziiert zu sein. Als wichtigster neuer Befund konnte eine signifikant um 20% ($p=0,022$) erniedrigte intrazelluläre Konzentration der proteinanabol und antiproteolytisch wirksamen Aminosäure Leucin mit Korrelation zum Gewichtsverlust ($p=0,046$) gezeigt werden. Bei 1,782- und 1,822-fach erhöhter Expression der transmembranären Transporter *SNAT2* ($p=0,013$) und *LAT1* ($p=0,072$) blieb die Ursache des intrazellulären Leucinmangels jedoch unklar, zumal das extrazelluläre Leucin-Angebot mangels Blutproben nicht bestimmt werden konnte.

Hinweise auf ein pro-inflammatorisches Milieu bei Kachexie im Vergleich zu Kontrollen ergaben sich anhand einer signifikant erhöhten Expression von *CD68* (1,48-fach, $p=0,040$) als Zeichen auf eine Makrophagen-Infiltration, sowie einer signifikant verminderter Expression von der für Synthese und Reduktion des Antioxidans Glutathion wichtigen *GCS* (0,831-fach, $p=0,036$) und *GSR* (0,657-fach, $p=0,026$). Zugleich zeigten sich im Protein-Array folgende Entzündungsfaktoren erhöht: *IL1 β* (1,41-fach), *IL6* (1,50-fach), *IL8* (1,48-fach), *TNF* (1,87-fach), Interferon- γ (1,14-fach), *CRP* (1,55-fach) und *IL32* (3,03-fach). Die mRNA Expression von *IL1 β* , *IL6*, *IL8*, und *TNF* war dagegen nicht-signifikant erhöht. Die mRNA Expression der Monoaminoxidasen als möglicher Quelle von oxidativem Stress zeigte ein uneinheitliches Bild, sie war bei *MAOA* 0,19-fach ($p=0,030$) dagegen bei *MAOB* 1,4-fach ($p=0,047$) verändert. Zudem zeigten sich um 33% vermehrte Kapillarkontakte der Muskelfasern ($p=0,097$) und auf Proteinebene ein Trend zu pro-angiogenetischen Signalen: *VEGF* war 1,30-fach, Angiopoietin-1 2,07-fach, Angiopoietin-2 1,77-fach erhöht und *PF4* 0,16-fach supprimiert bei unveränderten Genexpression von *VEGFA*, *VEGFB* und *KDR*.

In der Zusammenschau dieser neuen Daten zum humanen Skelettmuskel bei Tumorkachexie kann festgestellt werden, dass zu einem frühen, präatrophischen Zeitpunkt der Kachexie, Leucin, als wesentliches anaboles Signal, intrazellulär signifikant erniedrigt ist. Zugleich besteht ein inflammatorisches Milieu einhergehend mit einem Trend zur Angiogeneese und vermutlich gesteigerter Muskelregeneration. Diese frühe metabolische und inflammatorische Störung im noch nicht atrophierten Skelettmuskel dürfte als möglicher Präventions- und Therapieansatz der Tumorkachexie relevant sein. Für weiterführende klinische Studien wurden in der vorliegenden Arbeit Zeitfenster und Parameter einer „Myositis-Phase“ innerhalb des Kachexieprozesses identifiziert.

6. SUMMARY

The complex syndrome of cancer-associated cachexia, an unintentional loss of muscle (and fat) mass, presents an oncological challenge: It reduces the patients' quality of life and mobility and may lead to death e.g. via respiratory muscle insufficiency. 20% of all carcinoma patients are estimated to die of cancer cachexia, yet neither is the underlying mechanism fully understood nor is the condition therapeutically controllable. Studies on human tissue samples, in particular on skeletal muscle, are scarce and have yielded ambiguous results in contrast to those in cell cultures and animal models. Pancreatic carcinoma is the clinically most impressive example of a malignancy with the most severe and rapid cachexia development. Therefore the aim of this thesis was to evaluate the cancer cachexia-associated changes in skeletal muscle biopsies from patients with pancreatic cancer at the time of their first surgery. The analyses comprised muscle fiber morphometry, the concentration of metabolically important amino acids and the expression of pro-inflammatory, -angiogenetic, -atrophic and -apoptotic signals on RNA as well as protein levels. The study included intraoperative skeletal muscle biopsies from the rectus abdominis muscle of 36 patients with histologically confirmed ductal pancreatic carcinoma. The group of patients with cachexia (N=16) was compared with that without cachexia (N=22, control group). Cancer cachexia was defined as unintentional weight loss of at least 10% over the past 6 months. Transverse cryosections of rectus abdominis muscle were stained for myofibrillar ATPase to measure size, density and composition of muscle fibers, for CD31 to measure capillary contacts and for haemalum to measure centralized nuclei. In addition, the intracellular concentration of 26 amino acids was analyzed by HPLC, differential expression of 29 genes was determined via qRT-PCR, and pools of tissue samples were screened for 102 proteins using a protein array.

Contrary to expectations, no significant decrease in muscle fiber size or increase in density as in muscle atrophy was observed with cachexia compared to the control group. Neither cachexia-associated upregulation of muscle-specific E3-ligases *TRIM63* and *FBXO32* of the ubiquitin system, commonly used as proteolysis markers, nor upregulation of *BAX* and *CASP3* (pro-apoptotic signals) were detected. But the protein expression of Fas ligand was 2.32-fold increased and the expression of RNA of the antiapoptotic *BCL2* was significantly 0.49-fold lower ($p=0.028$). Abundance of cells with centralized nuclei was significantly increased by 7% ($p=0.031$) in muscle fiber type I and over all fiber types by 5% ($p=0.085$), likely indicating increased muscle regeneration, though *PAX7* expression remained unaltered. As a main new finding, there was a significant 20% ($p=0.022$) decrease in the intracellular concentration of the protein anabolic and

antiproteolytic amino acid leucine, which, notably, correlated to weight loss ($p=0.046$). The concomitant finding of 1.782- and 1.822-fold increased expression of the transmembrane transporters *SNAT2* ($p=0.013$) and *LAT1* ($p=0.072$), respectively, did not allow any conclusion on (limited) leucine uptake, especially as no blood samples were available for extracellular leucine measurements.

The present study provided evidence for a pro-inflammatory milieu with cachexia compared to controls in terms of a significantly increased expression of *CD68* (1.48-fold, $p=0.040$), indicating macrophage infiltration, and, moreover, a significantly decreased relative expression of *GCS* (0.831-fold; $p=0.036$) and *GSR* (0.657-fold, $p=0.026$) as involved in syntheses and reduction of the antioxidant glutathione, respectively. Correspondingly the following inflammatory factors were increased in the protein array: $IL1\beta$ (1.41-fold), *IL6* (1.50-fold), *IL8* (1.48-fold), *TNF* (1.87-fold), interferon- γ (1.14x), *CRP* (1.55-fold), and *IL32* (3.03-fold). The mRNA expressions of *IL1\beta*, *IL6*, *IL8* and *TNF* were, however, not significantly increased. The mRNA expressions of the monoamine oxidases, as a possible source of oxidative stress, were inconsistent, as changes in *MAOA* expression were 0.19-fold ($p=0.030$) while those of *MAOB* were 1.4-fold ($p=0.047$). In line with pro-inflammatory changes, a 33% increase in capillary contacts of the muscle fibers ($p=0.097$) was observed along with, by trend, higher protein levels of pro-angiogenetic signals: *VEGF* was 1.30-fold, angipoinetin-1 2.07-fold, Angiopoietin-2 1.77-fold increased and *PF4* was 0.16-fold suppressed. The mRNA expressions of *VEGFA*, *VEGFB* and *KDR* were, however, unchanged.

In synopsis of these new human data on human skeletal muscle from patients with pancreatic cancer, it can be stated that at an early pre-atrophic stage of cachexia intracellular leucine, as an essential anabolic mediator, is significantly reduced. At the same time there is an inflammatory milieu associated with a trend towards angioneogenesis and possibly increased muscle regeneration. This early metabolic and inflammatory condition in not yet atrophied skeletal muscle may be relevant as a possible target for prevention and a therapeutic approach to cancer cachexia. A relevant time window and a set of parameters for characterization of a “myositis-like-phase” of cachexia development were identified for further clinical studies.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Acharyya, S; Butchbach, M E; Sahenk, Z; Wang, H et al. (2005): Dystrophin glycoprotein complex dysfunction: a regulatory link between muscular dystrophy and cancer cachexia. In: *Cancer cell* 8 (5), 421–432.
- Akira, S; Taga, T; Kishimoto, T (1993): Interleukin-6 in Biology and Medicine. In: Frank J. Dixon und Henry G. Kunkel (Hg.): *Advances in immunology*, Bd. 54. New York: Academic Press (Advances in Immunology), 1–78.
- Albelda, S M; Muller, W A; Buck, C A; Newman, P J et al. (1991): Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): a novel vascular cell-cell adhesion molecule. In: *The Journal of cell biology* 114 (5), 1059–1068.
- Alexiou-Puljer, A (2008): *Langenscheidt Universal-Wörterbuch Griechisch. Griechisch-Deutsch, Deutsch-Griechisch ; [extra: Reise-Dolmetscher]*. Berlin: Langenscheidt.
- Andersen, C L; Jensen, J L; Ørntoft, T F (2004): Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. In: *Cancer research* 64 (15), 5245–5250.
- Ando, K; Takahashi, F; Motojima, S; Nakashima, K et al. (2013): Possible role for tocilizumab, an anti-interleukin-6 receptor antibody, in treating cancer cachexia. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 31 (6), e69-72.
- Argilés, J M; Alvarez, B; López-Soriano, F J (1997): The metabolic basis of cancer cachexia. In: *Medicinal research reviews* 17 (5), 477–498.
- Argilés, J M; Busquets, S; Felipe, A; López-Soriano, F J et al. (2005): Molecular mechanisms involved in muscle wasting in cancer and ageing. Cachexia versus sarcopenia. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 37 (5), 1084–1104.
- Argilés, J M; Busquets, S; López-Soriano, F J (2001): Metabolic interrelationships between liver and skeletal muscle in pathological states. In: *Life sciences* 69 (12), 1345–1361.
- Argilés, J M; Busquets, S; Moore-Carrasco, R; Figueras, M et al. (2007): Targets in clinical oncology: the metabolic environment of the patient. In: *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 12, 3024–3051.
- Argilés, J M; Busquets, S; Stemmler, B; López-Soriano, F J et al. (2014): Cancer cachexia. Understanding the molecular basis. In: *Nat Rev Cancer* 14 (11), 754–762.
- Argilés, J M; Garcia-Martínez, C; Llovera, M; López-Soriano, F J et al. (1992): The role of cytokines in muscle wasting. Its relation with cancer cachexia. In: *Med. Res. Rev.* 12 (6), 637–652.
- Argilés, J M; Lopez-Soriano, F J (1999): The role of cytokines in cancer cachexia. In: *Medicinal research reviews* 19 (3), 223–248.

- Argilés, J M; López-Soriano, F J (1990): The oxidation of leucine in tumour-bearing rats. In: *The Biochemical journal* 268 (1), 241–244.
- Argilés, J M; López-Soriano, F J; Busquets, S (2012): Counteracting Inflammation. A Promising Therapy in Cachexia. In: *Crit Rev Oncog* 17 (3), 253–262.
- Asp, M L; Tian, M; Wendel, A A; Belury, M A et al. (2010): Evidence for the contribution of insulin resistance to the development of cachexia in tumor-bearing mice. In: *International journal of cancer* 126 (3), 756–763.
- Atherton, P J; Kumar, V; Selby, A; Rankin, D et al. (2016): Enriching a protein drink with leucine augments muscle protein synthesis after resistance exercise in young and older men. In: *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*.
- Aulino, P; Berardi, E; Cardillo, V M; Rizzuto, E et al. (2010): Molecular, cellular and physiological characterization of the cancer cachexia-inducing C26 colon carcinoma in mouse. In: *BMC cancer* 10, 363.
- Bachmann, J; Heiligensetzer, M; Krakowski-Roosen, H; Buchler, M W et al. (2008): Cachexia worsens prognosis in patients with resectable pancreatic cancer. In: *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* 12 (7), 1193–1201.
- Bachmann, J; Ketterer, K; Marsch, C; Fechtner, K et al. (2009): Pancreatic cancer related cachexia: influence on metabolism and correlation to weight loss and pulmonary function. In: *BMC cancer* 9, 255.
- Bachmann, K D; Berger, H; Bierich, J; Boda, D et al. (2013): Monatsschrift Kinderheilkunde: Organ der Deutschen Gesellschaft für Kinderheilkunde. V. Differentialdiagnostische Bedeutung der Muskelbiopsie bei myogenen und neuromuskulären Erkrankungen. Unter Mitarbeit von U.-P. Ketelsen: Springer Berlin Heidelberg.
- Baenkler, H-W; Goldschmidt, H; Hahn, J-M (2015): Kurzlehrbuch Innere Medizin. 3. Aufl. s.l.: Georg Thieme Verlag KG.
- Balisardo Minamoto, V; Roberto Grazziano, C; Fatima Salvini, T de (1999): Effect of single and periodic contusion on the ratsoleus muscle at different stages of regeneration. In: *Anat. Rec.* 254 (2), 281–287.
- Baltimore, D (1970): Viral RNA-dependent DNA Polymerase. RNA-dependent DNA Polymerase in Virions of RNA Tumour Viruses. In: *Nature* 226 (5252), 1209–1211.
- Batista, M L; Henriques, F S; Neves, R; Olivan, M R et al. (2016): Cachexia-associated adipose tissue morphological rearrangement in gastrointestinal cancer patients. In: *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle* 7 (1), 37–47.
- Bergström, J; Fürst, P; Holmström, B U; Vinnars, E et al. (1981): Influence of injury and nutrition on muscle water electrolytes: effect of elective operation. In: *Annals of surgery* 193 (6), 810–816.
- Beutler, B; Cerami, A (1986): Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin. In: *Nature* 320 (6063), 584–588.

- Biggs, W 3; Meisenhelder, J; Hunter, T; Cavenee, W K et al. (1999): Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (13), 7421–7426.
- Blum, D; Omlin, A; Fearon, K C; Baracos, V E et al. (2010): Evolving classification systems for cancer cachexia: ready for clinical practice? In: *Supportive care in cancer : official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer* 18 (3), 273–279.
- Bodine, S C; Latres, E; Baumhueter, S; Lai, V K et al. (2001): Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. In: *Science (New York, N.Y.)* 294 (5547), 1704–1708.
- Bonetto, A; Aydogdu, T; Kunzevitzky, N; Guttridge, D C et al. (2011): STAT3 activation in skeletal muscle links muscle wasting and the acute phase response in cancer cachexia. In: *PLoS ONE* 6 (7), e22538.
- Bossola, M; Mirabella, M; Ricci, E; Costelli, P et al. (2006): Skeletal muscle apoptosis is not increased in gastric cancer patients with mild-moderate weight loss. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 38 (9), 1561–1570.
- Bradford, M M (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Analytical Biochemistry* 72 (1-2), 248–254.
- Brooke, M H; Kaiser, K K (1970): Muscle Fiber Types. How Many and What Kind? In: *Archives of Neurology* 23 (4), 369–379.
- Brosnan, J T (2003): Interorgan amino acid transport and its regulation. In: *The Journal of nutrition* 133 (6 Suppl 1), 2068S-2072S.
- Brown, D J; Milroy, R; Preston, T; McMillan, D C et al. (2007): The relationship between an inflammation-based prognostic score (Glasgow Prognostic Score) and changes in serum biochemical variables in patients with advanced lung and gastrointestinal cancer. In: *Journal of clinical pathology* 60 (6), 705–708.
- Bruusgaard, J C; Liestøl, K; Ekmark, M; Kollstad, K et al. (2003): Number and spatial distribution of nuclei in the muscle fibres of normal mice studied in vivo. In: *The Journal of Physiology* 551 (Pt 2), 467.
- Buck, M; Chojkier, M (1996): Muscle wasting and dedifferentiation induced by oxidative stress in a murine model of cachexia is prevented by inhibitors of nitric oxide synthesis and antioxidants. In: *The EMBO journal* 15 (8), 1753–1765.
- Burckart, K; Beca, S; Urban, R J; Sheffield-Moore, M et al. (2010): Pathogenesis of muscle wasting in cancer cachexia. Targeted anabolic and anticatabolic therapies. In: *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 13 (4), 410–416.
- Burton, E R; Libutti, S K (2009): Targeting TNF-alpha for cancer therapy. In: *Journal of biology* 8 (9), 85.

- Busquets, S; Deans, C; Figueras, M; Moore-Carrasco, R et al. (2007): Apoptosis is present in skeletal muscle of cachectic gastro-intestinal cancer patients. In: *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)* 26 (5), 614–618.
- Cady, J (2007): Nutritional support during radiotherapy for head and neck cancer: the role of prophylactic feeding tube placement. In: *Clinical journal of oncology nursing* 11 (6), 875–880.
- Carbo, N; Lopez-Soriano, J; Costelli, P; Busquets, S et al. (2000): Interleukin-15 antagonizes muscle protein waste in tumour-bearing rats. In: *British journal of cancer* 83 (4), 526–531.
- Carlson, B M (1973): The regeneration of skeletal muscle. A review. In: *The American journal of anatomy* 137 (2), 119–149.
- Carson, J A; Baltgalvis, K A (2010): Interleukin 6 as a key regulator of muscle mass during cachexia. In: *Exercise and sport sciences reviews* 38 (4), 168–176.
- Casperson, S L; Sheffield-Moore, M; Hewlings, S J; Paddon-Jones, D et al. (2012): Leucine supplementation chronically improves muscle protein synthesis in older adults consuming the RDA for protein. In: *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)* 31 (4), 512–519.
- Castell, J V; Gomez-Lechon, M J; David, M; Andus, T et al. (1989): Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes. In: *FEBS letters* 242 (2), 237–239.
- Ceglia, L (2009): Vitamin D and its role in skeletal muscle. In: *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 12 (6), 628–633.
- Chen, Y; Ye, J; Cao, L; Zhang, Y et al. (2010): Myostatin regulates glucose metabolism via the AMP-activated protein kinase pathway in skeletal muscle cells. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 42 (12), 2072–2081.
- Chomczynski, P; Sacchi, N (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. In: *Analytical Biochemistry* 162 (1), 156–159.
- Christensen, N J (1970): Abnormally high plasma catecholamines at rest and during exercise in ketotic juvenile diabetics. In: *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 26 (4), 343–344.
- Clark, K A; McElhinny, A S; Beckerle, M C; Gregorio, C C et al. (2002): Striated muscle cytoarchitecture. An intricate web of form and function. In: *Annual review of cell and developmental biology* 18, 637–706.
- Clarke, B A; Drujan, D; Willis, M S; Murphy, L O et al. (2007): The E3 Ligase MuRF1 Degrades Myosin Heavy Chain Protein in Dexamethasone-Treated Skeletal Muscle. In: *Cell Metabolism* 6 (5), 376–385.
- Conboy, I M; Rando, T A (2005): Aging, stem cells and tissue regeneration: lessons from muscle. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 4 (3), 407–410.
- Cosper, P F; Leinwand, L A (2012): Myosin heavy chain is not selectively decreased in murine cancer cachexia. In: *International journal of cancer* 130 (11), 2722–2727.

- Costelli, P; Garcia-Martínez, C; Llovera, M; Carbo, N et al. (1995): Muscle protein waste in tumor-bearing rats is effectively antagonized by a beta 2-adrenergic agonist (clenbuterol). Role of the ATP-ubiquitin-dependent proteolytic pathway. In: *The Journal of clinical investigation* 95 (5), 2367–2372.
- Davis, T W; Zweifel, B S; O'Neal, J M; Heuvelman, D M et al. (2004): Inhibition of cyclooxygenase-2 by celecoxib reverses tumor-induced wasting. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 308 (3), 929–934.
- Derbre, F; Assi, M; Lefeuve-Orfila, L; Vincent, S et al. (2014): Antioxidants and muscle atrophy in colon cancer: beneficial or deleterious effects? In: *Free radical biology & medicine* 75 Suppl 1, S22.
- Devine, R D; Bicer, S; Reiser, P J; Velten, M et al. (2015): Metalloproteinase expression is altered in cardiac and skeletal muscle in cancer cachexia. In: *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 309 (4), H685-H691.
- Dewys, W D; Begg, C; Lavin, P T; Band, P R et al. (1980): Prognostic effect of weight loss prior to chemotherapy in cancer patients. Eastern Cooperative Oncology Group. In: *The American journal of medicine* 69 (4), 491–497.
- Dhanapal, R; Saraswathi, T R; Rajkumar, G (2011): Cancer cachexia. In: *J Oral Maxillofac Pathol* 15 (3), 257.
- Dodd, K M; Tee, A R (2012): Leucine and mTORC1: a complex relationship. In: *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 302 (11), E1329-E1342.
- Dornblüth, O; Pschyrembel, W (2004): Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. [... enthält ... 330 Tabellen]. 260., neu bearb. Aufl. Berlin [u.a.]: De Gruyter.
- Dubowitz, V; Sewry, C A; Lane, R J (2007): Muscle biopsy: A practical approach. 3rd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier.
- Durham, W J; Dillon, E L; Sheffield-Moore, M (2009): Inflammatory burden and amino acid metabolism in cancer cachexia. In: *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 12 (1), 72–77.
- Eden, E; Edstrom, S; Bennegard, K; Schersten, T et al. (1984): Glucose flux in relation to energy expenditure in malnourished patients with and without cancer during periods of fasting and feeding. In: *Cancer research* 44 (4), 1718–1724.
- Edstrom, E; Altun, M; Hagglund, M; Ulfhake, B et al. (2006): Atrogin-1/MAFbx and MuRF1 are downregulated in aging-related loss of skeletal muscle. In: *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* 61 (7), 663–674.
- Eley, H L; Skipworth, R J; Deans, D A; Fearon, K C et al. (2007): Increased expression of phosphorylated forms of RNA-dependent protein kinase and eukaryotic initiation factor 2 α may signal skeletal muscle atrophy in weight-losing cancer patients. In: *Br J Cancer* 98 (2), 443–449.
- Elgzyri, T; Parikh, H; Zhou, Y; Dekker Nitert, M et al. (2012): First-degree relatives of type 2 diabetic patients have reduced expression of genes involved in fatty acid metabolism in skeletal muscle. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 97 (7), E1332-7.

- Elliott, B; Renshaw, D; Getting, S; Mackenzie, R et al. (2012): The central role of myostatin in skeletal muscle and whole body homeostasis. In: *Acta physiologica (Oxford, England)* 205 (3), 324–340.
- Emery, P W; Edwards, R H; Rennie, M J; Souhami, R L et al. (1984): Protein synthesis in muscle measured in vivo in cachectic patients with cancer. In: *British Medical Journal (Clinical research ed.)* 289 (6445), 584–586.
- Engelhardt, W von; Aurich, C (2010): Physiologie der Haustiere: 90 Tabellen: Enke.
- Evans, W J; Morley, J E; Argilés, J M; Bales, C et al. (2008): Cachexia: a new definition. In: *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)* 27 (6), 793–799.
- Evans, W K; Makuch, R; Clamon, G H; Feld, R et al. (1985): Limited Impact of Total Parenteral Nutrition on Nutritional Status during Treatment for Small Cell Lung Cancer. In: *Cancer Res* 45 (7), 3347–3353.
- Fearon, K C (1992): The mechanisms and treatment of weight loss in cancer. In: *Proc. Nutr. Soc.* 51 (02), 251–265.
- Fearon, K C (2012): The 2011 ESPEN Arvid Wretling lecture: Cancer cachexia: The potential impact of translational research on patient-focused outcomes. In: *Clinical Nutrition* 31 (5), 577–582.
- Fearon, K C; Falconer, J S; Slater, C; McMillan, D C et al. (1998): Albumin synthesis rates are not decreased in hypoalbuminemic cachectic cancer patients with an ongoing acute-phase protein response. In: *Annals of surgery* 227 (2), 249–254.
- Fearon, K C; Glass, D J; Guttridge, D C (2012): Cancer cachexia: mediators, signaling, and metabolic pathways. In: *Cell Metabolism* 16 (2), 153–166.
- Fearon, K C; Strasser, F; Anker, S D; Bosaeus, I et al. (2011): Definition and classification of cancer cachexia. An international consensus. In: *The Lancet Oncology* 12 (5), 489–495.
- Feinstein, R; Kanety, H; Papa, M Z; Lunenfeld, B et al. (1993): Tumor necrosis factor- α suppresses insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor and its substrates. In: *The Journal of biological chemistry* 268 (35), 26055–26058.
- Fitzgerald, T L; Hickner, Z J; Schmitz, M; Kort, E J et al. (2008): Changing incidence of pancreatic neoplasms. A 16-year review of statewide tumor registry. In: *Pancreas* 37 (2), 134–138.
- Folker, E S; Baylies, M K (2013): Nuclear positioning in muscle development and disease. In: *Frontiers in Physiology* 4.
- Gallmeier, E; Gress, T M (2018): Duktales Adenokarzinom des Pankreas. In: *Der Internist* 59 (8), 805–822.
- Gannon, N P; Vaughan, R A (2016): Leucineinduced anabolic/catabolism: two sides of the same coin. In: *Amino acids* 48 (2), 321–336.
- Ganten, D; Gay, S; Kalden, J R; Ruckpaul, K et al. (2013): Molekularmedizinische Grundlagen von rheumatischen Erkrankungen: Springer Berlin Heidelberg.

- Gekle, M; Wischmeyer, E; Gründer, S; Petersen, M et al. (2015): Taschenlehrbuch Physiologie. 2., überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme.
- Gilmore, T D (2006): Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. In: *Oncogene* 25 (51), 6680–6684.
- Gingras, A C; Raught, B; Sonenberg, N (2001): Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. In: *Genes & development* 15 (7), 807–826.
- Gold, J; High, H A; Li, Y; Michelmore, H et al. (1996): Safety and efficacy of nandrolone decanoate for treatment of wasting in patients with HIV infection. In: *AIDS (London, England)* 10 (7), 745–752.
- Gordon, J N; Trebble, T M; Ellis, R D; Duncan, H D et al. (2005): Thalidomide in the treatment of cancer cachexia: a randomised placebo controlled trial. In: *Gut* 54 (4), 540–545.
- Gran, P; Cameron-Smith, D (2011): The actions of exogenous leucine on mTOR signalling and amino acid transporters in human myotubes. In: *BMC physiology* 11, 10.
- Greenfield, J G (1957): An Atlas of Muscle Pathology in Neuromuscular Disease (26).
- Grimsby, J; Lan, N C; Neve, R; Chen, K et al. (1990): Tissue distribution of human monoamine oxidase A and B mRNA. In: *Journal of neurochemistry* 55 (4), 1166–1169.
- Gröger, D; Harkin, J; Bohlmann, F; Muirhead, H et al. (2013): *Naturstoffe*: Springer Berlin Heidelberg.
- Guttridge, D C; Mayo, M W; Madrid, L V; Wang, C Y et al. (2000): NF-kappaB-induced loss of MyoD messenger RNA: possible role in muscle decay and cachexia. In: *Science (New York, N.Y.)* 289 (5488), 2363–2366.
- Hack, V; Gross, A; Kinscherf, R; Bockstette, M et al. (1996a): Abnormal glutathione and sulfate levels after interleukin 6 treatment and in tumor-induced cachexia. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 10 (10), 1219–1226.
- Hack, V; Stutz, O; Kinscherf, R; Schykowski, M et al. (1996b): Elevated venous glutamate levels in (pre)catabolic conditions result at least partly from a decreased glutamate transport activity. In: *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 74 (6), 337–343.
- Ham, D J; Caldow, M K; Chhen, V; Chee, A et al. (2016): Glycine restores the anabolic response to leucine in a mouse model of acute inflammation. In: *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 310 (11), E970-81.
- Hamada, M; Abe, M; Miyake, T; Kawasaki, K et al. (2011): B cell-activating factor controls the production of adipokines and induces insulin resistance. In: *Obesity (Silver Spring, Md.)* 19 (10), 1915–1922.
- Hamel, F G; Upward, J L; Siford, G L; Duckworth, W C et al. (2003): Inhibition of proteasome activity by selected amino acids. In: *Metabolism: clinical and experimental* 52 (7), 810–814.

- Hasselgren, P O (1999): Glucocorticoids and muscle catabolism. In: *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 2 (3), 201–205.
- Hawke, T J; Garry, D J (2001): Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. In: *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 91 (2), 534–551.
- He, W A; Berardi, E; Cardillo, V M; Acharyya, S et al. (2013): NF- κ B-mediated Pax7 dysregulation in the muscle microenvironment promotes cancer cachexia. In: *J. Clin. Invest.* 123 (11), 4821–4835.
- Holm, E; Hagmuller, E; Staedt, U; Schlickeiser, G et al. (1995): Substrate balances across colonic carcinomas in humans. In: *Cancer research* 55 (6), 1373–1378.
- Holm, E; Hildebrandt, W; Kinscherf, R; Droge, W et al. (2007): Low postabsorptive net protein degradation in male cancer patients: lack of sensitivity to regulatory amino acids? In: *Oncology reports* 17 (3), 695–700.
- Holness, C L; Simmons, D L (1993): Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. In: *Blood* 81 (6), 1607–1613.
- Holroyde, C P; Skutches, C L; Boden, G; Reichard, G A et al. (1984): Glucose metabolism in cachectic patients with colorectal cancer. In: *Cancer research* 44 (12 Pt 1), 5910–5913.
- Hotamisligil, G S (1999): Mechanisms of TNF- α -induced insulin resistance. In: *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association* 107 (2), 119–125.
- Houslay, M D; Tipton, K F (1974): A kinetic evaluation of monoamine oxidase activity in rat liver mitochondrial outer membranes. In: *Biochemical Journal* 139 (3), 645–652.
- Hyde, R; Peyrollier, K; Hundal, H S (2002): Insulin promotes the cell surface recruitment of the SAT2/ATA2 system A amino acid transporter from an endosomal compartment in skeletal muscle cells. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (16), 13628–13634.
- Iwase, S; Murakami, T; Saito, Y; Nakagawa, K et al. (2004): Steep elevation of blood interleukin-6 (IL-6) associated only with late stages of cachexia in cancer patients. In: *European cytokine network* 15 (4), 312–316.
- Izumiya, Y; Hopkins, T; Morris, C; Sato, K et al. (2008): Fast/Glycolytic muscle fiber growth reduces fat mass and improves metabolic parameters in obese mice. In: *Cell Metabolism* 7 (2), 159–172.
- Jacobi, C; Hatakeyama, S; Latario, B; Mueller, A., Grosjean, J. et al. (2011): Effect of plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) in rodent cancer cachexia and sarcopenia. Abstracts of the 6th Cachexia Conference, Milan, Italy, December 8-10, 2011. In: *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle* 2 (4), 209–261.
- Jansohn, M; Rothhämel, S (2012): Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor: Spektrum Akademischer Verlag.
- Jatoi, A; Ritter, H L; Dueck, A; Nguyen, P L et al. (2010): A placebo-controlled, double-blind trial of infliximab for cancer-associated weight loss in elderly and/or poor

- performance non-small cell lung cancer patients (N01C9). In: *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 68 (2), 234–239.
- Johns, N; Hatakeyama, S; Stephens, N A; Degen, M et al. (2014): Clinical Classification of Cancer Cachexia. Phenotypic Correlates in Human Skeletal Muscle. In: *PLoS ONE* 9 (1), e83618.
- Johns, N; Stephens, N A; Fearon, K C (2013): Muscle wasting in cancer. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 45 (10), 2215–2229.
- Judge, S M; Nosacka, R L; Delitto, D; Gerber, M H et al. (2018): Skeletal Muscle Fibrosis in Pancreatic Cancer Patients with Respect to Survival. In: *JNCI cancer spectrum* 2 (3), pky043.
- Kaatsch, P; Spix, C; Katalinic, A; Hentschel, S et al. (2015): Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes - Krebs in Deutschland 2011/2012. 10., Ausgabe. Berlin: Robert Koch-Institut (Gesundheitsberichterstattung für Deutschland).
- Kamei, Y; Miura, S; Suzuki, M; Kai, Y et al. (2004): Skeletal muscle FOXO1 (FKHR) transgenic mice have less skeletal muscle mass, down-regulated Type I (slow twitch/red muscle) fiber genes, and impaired glycemic control. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (39), 41114–41123.
- Kausch, W (1912): Das Carcinom der Papilla Duodeni und seine radikale Entfernung. In: *Beiträge klinische Chirurgie* 78 (439), 29–33.
- Kimball, S R; Jefferson, L S (2001): Regulation of protein synthesis by branched-chain amino acids. In: *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 4 (1), 39–43.
- Koh, T J; Bryer, S C; Pucci, A M; Sisson, T H et al. (2005): Mice deficient in plasminogen activator inhibitor-1 have improved skeletal muscle regeneration. In: *American journal of physiology. Cell physiology* 289 (1), C217-23.
- Koolman, J; Röhm, K H (2009): Taschenatlas Biochemie des Menschen: Thieme.
- Kotler, D P (2000): Cachexia. In: *Ann Intern Med* 133 (8), 622.
- Krzystek-Korpacka, M; Matusiewicz, M; Diakowska, D; Grabowski, K et al. (2008): Acute-phase response proteins are related to cachexia and accelerated angiogenesis in gastroesophageal cancers. In: *Clinical chemistry and laboratory medicine* 46 (3), 359–364.
- Kusakabe, A; Sato, A; Sugiura, R; Koide, T et al. (2011): The role of percutaneous endoscopic gastrostomy(PEG)in palliative care. In: *Gan to kagaku ryoho. Cancer & chemotherapy* 38 Suppl 1, 85–86.
- Lagirand-Cantaloube, J; Offner, N; Csibi, A; Leibovitch, M P et al. (2008): The initiation factor eIF3-f is a major target for atrogen1/MAFbx function in skeletal muscle atrophy. In: *The EMBO journal* 27 (8), 1266–1276.
- Langhans, W (2002): Peripheral mechanisms involved with catabolism. In: *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 5 (4), 419–426.

- Lazo, P A (1985): Tumour-host metabolic interaction and cachexia. In: *FEBS letters* 187 (2), 189–192.
- Lecker, S H; Jagoe, R T; Gilbert, A; Gomes, M et al. (2004): Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18 (1), 39–51.
- Leibovich, S J; Polverini, P J; Shepard, H M; Wiseman, D M et al. (1987): Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor-alpha. In: *Nature* 329 (6140), 630–632.
- Lelbach, A; Muzes, G; Feher, J (2007): Current perspectives of catabolic mediators of cancer cachexia. In: *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* 13 (9), 173.
- Lerner, L; Hayes, T G; Tao, N; Krieger, B et al. (2015): Plasma growth differentiation factor 15 is associated with weight loss and mortality in cancer patients. In: *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle* 6 (4), 317–324.
- Liu, K A; Lashinger, L M; Rasmussen, A J; Hursting, S D et al. (2014): Leucine supplementation differentially enhances pancreatic cancer growth in lean and overweight mice. In: *Cancer & metabolism* 2 (1), 6.
- Löffler, Georg; Heinrich, P. C.; Petrides, Petro E. (Hg.) (2007): Biochemie und Pathobiochemie. 8., völlig neu bearbeitete Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg (Springer-Lehrbuch).
- Loumaye, A; Barsy, M de; Nachit, M; Lause, P et al. (2015): Role of Activin A and myostatin in human cancer cachexia. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 100 (5), 2030–2038.
- Lüllmann-Rauch, R; Asan, E (2019): Taschenlehrbuch Histologie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Lundholm, K; Bennegard, K; Eden, E; Svaninger, G et al. (1982): Efflux of 3-methylhistidine from the leg in cancer patients who experience weight loss. In: *Cancer research* 42 (11), 4807–4811.
- Maltoni, M; Fabbri, L; Nanni, O; Scarpi, E et al. (1997): Serum levels of tumour necrosis factor alpha and other cytokines do not correlate with weight loss and anorexia in cancer patients. In: *Supportive care in cancer : official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer* 5 (2), 130–135.
- Mammucari, C; Milan, G; Romanello, V; Masiero, E et al. (2007): FoxO3 Controls Autophagy in Skeletal Muscle In Vivo. In: *Cell Metabolism* 6 (6), 458–471.
- Manoli, I; Le, H; Alesci, S; McFann, K K et al. (2005): Monoamine oxidase-A is a major target gene for glucocorticoids in human skeletal muscle cells. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19 (10), 1359–1361.
- Mantovani, G; Macciò, A; Madeddu, C; Gramignano, G et al. (2006): A phase II study with antioxidants, both in the diet and supplemented, pharmaconutritional

- support, progestagen, and anti-cyclooxygenase-2 showing efficacy and safety in patients with cancer-related anorexia/cachexia and oxidative stress. In: *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 15 (5), 1030–1034.
- Mantovani, G; Macciò, A; Madeddu, C; Serpe, R et al. (2010): Phase II nonrandomized study of the efficacy and safety of COX-2 inhibitor celecoxib on patients with cancer cachexia. In: *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 88 (1), 85–92.
- Martignoni, M E (1994): Liver macrophages contribute to pancreatic cancer-related cachexia. In: *Oncol Rep.*
- Martignoni, M E; Kunze, P; Hildebrandt, W; Kunzli, B et al. (2005): Role of mononuclear cells and inflammatory cytokines in pancreatic cancer-related cachexia. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 11 (16), 5802–5808.
- Mason, C C; Hanson, R L; Ossowski, V; Bian, L et al. (2011): Bimodal distribution of RNA expression levels in human skeletal muscle tissue. In: *BMC genomics* 12, 98.
- Mayer, P (1896): Über das Färben mit Hämatoxylin. In: *Mitt. zool. Stn. Neapel.* (303).
- McDowell, H E; Christie, G R; Stenhouse, G; Hundal, H S et al. (1995): Leucine activates system A amino acid transport in L6 rat skeletal muscle cells. In: *The American journal of physiology* 269 (5 Pt 1), C1287-94.
- McPherron, A C; Lawler, A M; Lee, S J (1997): Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. In: *Nature* 387 (6628), 83–90.
- Melville, S; McNurlan, M A; Calder, A G; Garlick, P J et al. (1990): Increased protein turnover despite normal energy metabolism and responses to feeding in patients with lung cancer. In: *Cancer research* 50 (4), 1125–1131.
- Meng, H; Janssen, P M; Grange, R W; Yang, L et al. (2014): Tissue triage and freezing for models of skeletal muscle disease. In: *Journal of visualized experiments : JoVE* (89).
- Mofarrahi, M; McClung, J M; Kontos, C D; Davis, E C et al. (2015): Angiopoietin-1 enhances skeletal muscle regeneration in mice. In: *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 308 (7), R576-89.
- Mohamed-Ali, V; Goodrick, S; Rawesh, A; Katz, D R et al. (1997): Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 82 (12), 4196–4200.
- Mondello, P; Mian, M; Aloisi, C; Famà, F et al. (2014): Cancer Cachexia Syndrome. Pathogenesis, Diagnosis, and New Therapeutic Options. In: *Nutrition and Cancer* 67 (1), 12–26.
- Montes de Oca, M; Loeb, E; Torres, S H; Sanctis, J de et al. (2008): Peripheral muscle alterations in non-COPD smokers. In: *Chest* 133 (1), 13–18.
- Mordier, S; Deval, C; Béchet, D; Tassa, A et al. (2000): Leucine Limitation Induces Autophagy and Activation of Lysosome-dependent Proteolysis in C2C12 Myotubes

- through a Mammalian Target of Rapamycin-independent Signaling Pathway. In: *J. Biol. Chem.* 275 (38), 29900–29906.
- Morley, J E; Thomas, D; Wilson, M M (2006): Cachexia: pathophysiology and clinical relevance. In: *The American journal of clinical nutrition* 83 (4), 735–743.
- Mueller, T C; Burmeister, M A; Bachmann, J; Martignoni, M E et al. (2014): Cachexia and pancreatic cancer: are there treatment options? In: *World journal of gastroenterology* 20 (28), 9361–9373.
- Mulisch, M; Welsch, U (2015): Romeis - Mikroskopische Technik. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Muller, W A; Ratti, C M; McDonnell, S L; Cohn, Z A et al. (1989): A human endothelial cell-restricted, externally disposed plasmalemmal protein enriched in intercellular junctions. In: *The Journal of experimental medicine* 170 (2), 399–414.
- Munoz-Canoves, P; Scheele, C; Pedersen, B K; Serrano, A L et al. (2013): Interleukin-6 myokine signaling in skeletal muscle. A double-edged sword? In: *FEBS J* 280 (17), 4131–4148.
- Nair, N P; Ahmed, S K; Kin, N M (1993): Biochemistry and pharmacology of reversible inhibitors of MAO-A agents: focus on moclobemide. In: *Journal of Psychiatry and Neuroscience* 18 (5), 214–225.
- Nissen, S; Sharp, R; Ray, M; Rathmacher, J A et al. (1996): Effect of leucine metabolite beta-hydroxy-beta-methylbutyrate on muscle metabolism during resistance-exercise training. In: *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 81 (5), 2095–2104.
- Nixon, D W; Heymsfield, S B; Cohen, A E; Kutner, M H et al. (1980): Protein-calorie undernutrition in hospitalized cancer patients. In: *The American Journal of Medicine* 68 (5), 683–690.
- Noguchi, Y; Vydelingum, N A; Brennan, M F (1989): The reversal of increased gluconeogenesis in the tumor-bearing rat by tumor removal and food intake. In: *Surgery* 106 (2), 423-30; discussion 430-1.
- Noguchi, Y; Yoshikawa, T; Marat, D; Doi, C et al. (1998): Insulin resistance in cancer patients is associated with enhanced tumor necrosis factor-alpha expression in skeletal muscle. In: *Biochemical and biophysical research communications* 253 (3), 887–892.
- Ostrowski, K; Rohde, T; Zacho, M; Asp, S et al. (1998): Evidence that interleukin-6 is produced in human skeletal muscle during prolonged running. In: *The Journal of Physiology* 508 (3), 949–953.
- Otis, J S; Brown, L A; Guidot, D M (2007): Oxidant-induced atrogin-1 and transforming growth factor- β 1 precede alcohol-related myopathy in rats. In: *Muscle & nerve* 36 (6), 842–848.
- Padykula, H A; Herman, E (1955): The Specificity of the Histochemical Method for Adenosine Triphosphatas. In: *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 3 (3), 170–195.

- Pessina, P; Conti, V; Pacelli, F; Rosa, F et al. (2010): Skeletal muscle of gastric cancer patients expresses genes involved in muscle regeneration. In: *Oncology reports* 24 (3), 741–745.
- Petersen, A M; Magkos, F; Atherton, P J; Selby, A et al. (2007): Smoking impairs muscle protein synthesis and increases the expression of myostatin and MAFbx in muscle. In: *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 293 (3), E843-8.
- Porporato, P E (2016): Understanding cachexia as a cancer metabolism syndrome. In: *Oncogenesis* 5, e200.
- Prado, C M; Bekaii-Saab, T; Doyle, L A; Shrestha, S et al. (2012): Skeletal muscle anabolism is a side effect of therapy with the MEK inhibitor: selumetinib in patients with cholangiocarcinoma. In: *British journal of cancer* 106 (10), 1583–1586.
- Preedy, V R; Adachi, J; Ueno, Y; Ahmed, S K et al. (2001): Alcoholic skeletal muscle myopathy: definitions, features, contribution of neuropathy, impact and diagnosis. In: *European journal of neurology* 8 (6), 677–687.
- Punzi, T; Fabris, A; Morucci, G; Biagioni, P et al. (2012): C-reactive protein levels and vitamin d receptor polymorphisms as markers in predicting cachectic syndrome in cancer patients. In: *Molecular diagnosis & therapy* 16 (2), 115–124.
- Purintrapiban, J; Wang, M C; Forsberg, N E (2003): Degradation of sarcomeric and cytoskeletal proteins in cultured skeletal muscle cells. In: *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* 136 (3), 393–401.
- Quinn, L S; Haugk, K L; Grabstein, K H (1995): Interleukin-15: a novel anabolic cytokine for skeletal muscle. In: *Endocrinology* 136 (8), 3669–3672.
- Rassow, J (2006): Biochemie. 50 Tabellen. Stuttgart: Thieme (Duale Reihe).
- Rebbapragada, A; Benchabane, H; Wrana, J L; Celeste, A J et al. (2003): Myostatin signals through a transforming growth factor beta-like signaling pathway to block adipogenesis. In: *Molecular and cellular biology* 23 (20), 7230–7242.
- Rennie, M J; Tipton, K D (2000): Protein and amino acid metabolism during and after exercise and the effects of nutrition. In: *Annual review of nutrition* 20, 457–483.
- Rihacek, M; Bienertova-Vasku, J; Valik, D; Sterba, J et al. (2015): B-Cell Activating Factor as a Cancer Biomarker and Its Implications in Cancer-Related Cachexia. In: *BioMed research international* 2015, 792187.
- Rommel, C; Bodine, S C; Clarke, B A; Rossman, R et al. (2001): Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. In: *Nature cell biology* 3 (11), 1009–1013.
- Salanova, M; Schiffl, G; Puttmann, B; Schoser, B G et al. (2008): Molecular biomarkers monitoring human skeletal muscle fibres and microvasculature following long-term bed rest with and without countermeasures. In: *Journal of anatomy* 212 (3), 306–318.

- Salazar-Degracia, A; Blanco, D; Vilà-Ubach, M; Biurrun, G et al. (2016): Phenotypic and metabolic features of mouse diaphragm and gastrocnemius muscles in chronic lung carcinogenesis: influence of underlying emphysema. In: *Journal of Translational Medicine* 14 (1), 244.
- Sandri, M; Sandri, C; Gilbert, A; Skurk, C et al. (2004): Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. In: *Cell* 117 (3), 399–412.
- Sato, Y; Iwamoto, J; Kanoko, T; Satoh, K et al. (2005): Low-dose vitamin D prevents muscular atrophy and reduces falls and hip fractures in women after stroke: a randomized controlled trial. In: *Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland)* 20 (3), 187–192.
- Schmidt, R F; Lang, F (2007): Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie. 30., neu bearbeitete und aktualisierte Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg (Springer-Lehrbuch).
- Schmidt, R F; Lang, F; Heckmann, M (2011): Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie. Berlin/Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Schmitt, T L; Kinscherf, R; Martignoni, M E; Friess, H et al. (2007a): Lower intramuscular free amino acids, carnosine and glutathione with reduced myofibrillar protein in cachectic compared to non-cachectic patients with pancreatic cancer.
- Schmitt, T L; Martignoni, M E; Bachmann, J; Fechtner, K et al. (2007b): Activity of the Akt-dependent anabolic and catabolic pathways in muscle and liver samples in cancer-related cachexia. In: *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 85 (6), 647–654.
- Schroeder, A; Mueller, O; Stocker, S; Salowsky, R et al. (2006): The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. In: *BMC molecular biology* 7, 3.
- Schuelke, M; Wagner, K R; Stolz, L E; Hübner, C et al. (2004): Myostatin Mutation Associated with Gross Muscle Hypertrophy in a Child. In: *N Engl J Med* 350 (26), 2682–2688.
- Schulze-Osthoff, K; Beyaert, R; Vandevorde, V; Haegeman, G et al. (1993): Depletion of the mitochondrial electron transport abrogates the cytotoxic and gene-inductive effects of TNF. In: *The EMBO journal* 12 (8), 3095–3104.
- Sciote, J J; Am Rowlerson; Hopper, C; Hunt, N P et al. (1994): Fibre type classification and myosin isoforms in the human masseter muscle. In: *Journal of the neurological sciences* 126 (1), 15–24.
- Scott, H R; McMillan, D C; Crilly, A; McArdle, C S et al. (1996): The relationship between weight loss and interleukin 6 in non-small-cell lung cancer. In: *British journal of cancer* 73 (12), 1560–1562.
- Shaw, J H; Wolfe, R R (1987): Fatty acid and glycerol kinetics in septic patients and in patients with gastrointestinal cancer. The response to glucose infusion and parenteral feeding. In: *Annals of surgery* 205 (4), 368–376.

- Siegel, R L; Miller, K D; Jemal, A (2019): Cancer statistics, 2019. In: *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 69 (1), 7–34.
- Silverthorn, D U (2009): Physiologie: Pearson Deutschland.
- Sirott, M N; Bajorin, D F; Wong, G Y; Tao, Y et al. (1993): Prognostic factors in patients with metastatic malignant melanoma. A multivariate analysis. In: *Cancer* 72 (10), 3091–3098.
- Sishi, B J; Engelbrecht, A-M (2011): Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) inactivates the PI3-kinase/PKB pathway and induces atrophy and apoptosis in L6 myotubes. In: *Cytokine* 54 (2), 173–184.
- Smerdu, V; Karsch-Mizrachi, I; Campione, M; Leinwand, L et al. (1994): Type IIx myosin heavy chain transcripts are expressed in type IIb fibers of human skeletal muscle. In: *The American journal of physiology* 267 (6 Pt 1), C1723-8.
- Smith, I J; Aversa, Z; Hasselgren, P O; Pacelli, F et al. (2011): Calpain activity is increased in skeletal muscle from gastric cancer patients with no or minimal weight loss. In: *Muscle & nerve* 43 (3), 410–414.
- Smith, R C; Lin, B K (2013): Myostatin inhibitors as therapies for muscle wasting associated with cancer and other disorders. In: *Current opinion in supportive and palliative care* 7 (4), 352–360.
- Stephens, N A; Gallagher, I J; Rooyackers, O; Skipworth, R J et al. (2010): Using transcriptomics to identify and validate novel biomarkers of human skeletal muscle cancer cachexia. In: *Genome medicine* 2 (1), 1.
- Stephenson, F H (2010): Calculations for Molecular Biology and Biotechnology: A Guide to Mathematics in the Laboratory 2e: Elsevier Science.
- Stern-Straeter, J; Bonaterra, G A; Hörmann, K; Kinscherf, R et al. (2009): Identification of valid reference genes during the differentiation of human myoblasts. In: *BMC molecular biology* 10, 66.
- Stone, C A; Kenny, R A; Healy, M; Walsh, J B et al. (2011): Vitamin D depletion: of clinical significance in advanced cancer? In: *Supportive care in cancer : official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer* 19 (7), 865–867.
- Sudo, M; Kano, Y (2009): Myofiber apoptosis occurs in the inflammation and regeneration phase following eccentric contractions in rats. In: *The journal of physiological sciences : JPS* 59 (6), 405–412.
- Sugden, P H; Fuller, S J (1991): Regulation of protein turnover in skeletal and cardiac muscle. In: *Biochemical Journal* 273 (Pt 1), 21–37.
- Tardif, N; Klaude, M; Lundell, L; Thorell, A et al. (2013): Autophagic-lysosomal pathway is the main proteolytic system modified in the skeletal muscle of esophageal cancer patients. In: *The American journal of clinical nutrition* 98 (6), 1485–1492.
- Tayek, J A (1992): A review of cancer cachexia and abnormal glucose metabolism in humans with cancer. In: *Journal of the American College of Nutrition* 11 (4), 445–456.

- Tayek, J A; Bistrian, B R; Hehir, D J; Martin, R et al. (1986): Improved protein kinetics and albumin synthesis by branched chain amino acid-enriched total parenteral nutrition in cancer cachexia. A prospective randomized crossover trial. In: *Cancer* 58 (1), 147–157.
- Temin, H M; Mizutani, S (1970): Viral RNA-dependent DNA Polymerase. RNA-dependent DNA Polymerase in Virions of Rous Sarcoma Virus. In: *Nature* 226 (5252), 1211–1213.
- Thompson, M P; Cooper, S T; Parry, B R; Tuckey, J A et al. (1993): Increased expression of the mRNA for hormone-sensitive lipase in adipose tissue of cancer patients. In: *Biochimica et biophysica acta* 1180 (3), 236–242.
- Tisdale, M J (1997): Biology of cachexia. In: *Journal of the National Cancer Institute* 89 (23), 1763–1773.
- Tisdale, M J (2002): Cachexia in cancer patients. In: *Nature reviews. Cancer* 2 (11), 862–871.
- Tisdale, M J (2009): Mechanisms of cancer cachexia. In: *Physiological reviews* 89 (2), 381–410.
- Tisdale, M J (2010): Cancer cachexia. In: *Current opinion in gastroenterology* 26 (2), 146–151.
- Ulfig, N (2015): Kurzlehrbuch Histologie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Umekawa, K; Kimura, T; Kudoh, S; Suzumura, T et al. (2013): Plasma RANTES, IL-10, and IL-8 levels in non-small-cell lung cancer patients treated with EGFR-TKIs. In: *BMC research notes* 6, 139.
- van Hall, G; Steensberg, A; Fischer, C; Keller, C et al. (2008): Interleukin-6 Markedly Decreases Skeletal Muscle Protein Turnover and Increases Nonmuscle Amino Acid Utilization in Healthy Individuals. In: *J Clin Endocrinol Metab* 93 (7), 2851–2858.
- van Koeveing, M; Nissen, S (1992): Oxidation of leucine and alpha-ketoisocaproate to beta-hydroxy-beta-methylbutyrate in vivo. In: *The American journal of physiology* 262 (1 Pt 1), E27-31.
- van Norren, K; Kegler, D; Argilés, J M; Luiking, Y et al. (2009): Dietary supplementation with a specific combination of high protein, leucine, and fish oil improves muscle function and daily activity in tumour-bearing cachectic mice. In: *British journal of cancer* 100 (5), 713–722.
- van Veldhuizen, P J; Taylor, S A; Williamson, S; Drees, B M et al. (2000): Treatment of vitamin D deficiency in patients with metastatic prostate cancer may improve bone pain and muscle strength. In: *The Journal of urology* 163 (1), 187–190.
- Vandesompele, J; Preter, K de; Pattyn, F; Poppe, B et al. (2002): Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. In: *Genome biology* 3 (7).
- Vaughan, R A; Garcia-Smith, R; Gannon, N P; Bisoffi, M et al. (2013): Leucine treatment enhances oxidative capacity through complete carbohydrate oxidation and

- increased mitochondrial density in skeletal muscle cells. In: *Amino acids* 45 (4), 901–911.
- Vazquez, F; Sellers, W R (2000): The PTEN tumor suppressor protein: an antagonist of phosphoinositide 3-kinase signaling. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1470 (1), M21-M35.
- Walsh, D; Mahmoud, F; Barna, B (2003): Assessment of nutritional status and prognosis in advanced cancer: interleukin-6, C-reactive protein, and the prognostic and inflammatory nutritional index. In: *Supportive care in cancer : official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer* 11 (1), 60–62.
- Warren, S (1932): The immediate cause of death in cancer. In: *The American journal of medicine* 184 (5), 610–615.
- Waterlow, J C; Jackson, A A (1981): Nutrition and protein turnover in man. In: *British medical bulletin* 37 (1), 5–10.
- Weber, A; Murray, J M (1973): Molecular control mechanisms in muscle contraction. In: *Physiological reviews* 53 (3), 612–673.
- Weber, M A; Kinscherf, R; Krakowski-Roosen, H; Aulmann, M et al. (2007): Myoglobin plasma level related to muscle mass and fiber composition: a clinical marker of muscle wasting? In: *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 85 (8), 887–896.
- Weber, M A; Krakowski-Roosen, H; Schröder, L; Kinscherf, R et al. (2009): Morphology, metabolism, microcirculation, and strength of skeletal muscles in cancer-related cachexia. In: *Acta Oncologica* 48 (1), 116–124.
- Wheeler, M T; Snyder, E C; Patterson, M N; Swoap, S J et al. (1999): An E-box within the MHC IIB gene is bound by MyoD and is required for gene expression in fast muscle. In: *The American journal of physiology* 276 (5 Pt 1), C1069-78.
- Whipple, A O; Parsons, W B; Mullins, C R (1935): Treatment of carcinoma of the ampulla of vater. In: *Annals of surgery* 102 (4), 763–779.
- WHO (2000): Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. In: *World Health Organization technical report series* 894, i-xii, 1-253.
- Williams, A; Sun, X; Fischer, J E; Hasselgren, P O et al. (1999): The expression of genes in the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway is increased in skeletal muscle from patients with cancer. In: *Surgery* 126 (4), 744–750.
- Winter, A; MacAdams, J; Chevalier, S (2012): Normal protein anabolic response to hyperaminoacidemia in insulin-resistant patients with lung cancer cachexia. In: *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)* 31 (5), 765–773.
- World Medical Association (2013): World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. In: *JAMA* 310 (20), 2191–2194.
- Yamaguchi, Y; Yamamoto, K; Sato, Y; Inoue, S et al. (2016): Combination of aspartic acid and glutamic acid inhibits tumor cell proliferation. In: *Biomedical research (Tokyo, Japan)* 37 (2), 153–159.

- Yamanaka, H; Kanemaki, T; Tsuji, M; Kise, Y et al. (1990): Branched-chain amino acid-supplemented nutritional support after gastrectomy for gastric cancer with special reference to plasma amino acid profiles. In: *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)* 6 (3), 241–245.
- Yoshida, H; Ishiko, O; Sumi, T; Honda, K I et al. (2001): Expression of apoptosis regulatory proteins in the skeletal muscle of tumor-bearing rabbits. In: *Japanese journal of cancer research : Gann* 92 (6), 631–637.
- Zachwieja, J J; Smith, S R; Sinha-Hikim, I; Gonzalez-Cadavid, N et al. (1999): Plasma myostatin-immunoreactive protein is increased after prolonged bed rest with low-dose T3 administration. In: *Journal of gravitational physiology : a journal of the International Society for Gravitational Physiology* 6 (2), 11–15.
- Zammit, P S; Golding, J P; Nagata, Y; Hudon, V et al. (2004): Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal? In: *The Journal of cell biology* 166 (3), 347–357.
- Zampieri, S; Doria, A; Adami, N; Biral, D et al. (2013): Subclinical myopathy in patients affected with newly diagnosed colorectal cancer at clinical onset of disease. Evidence from skeletal muscle biopsies. In: *Neurological Research* 32 (1), 20–25.
- Zhong, Z; Wheeler, M D; Li, X; Froh, M et al. (2003): L-Glycine: a novel antiinflammatory, immunomodulatory, and cytoprotective agent. In: *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 6 (2), 229–240.
- Zhou, X; Wang, J L; Lu, J; Song, Y et al. (2010): Reversal of cancer cachexia and muscle wasting by ActRIIB antagonism leads to prolonged survival. In: *Cell* 142 (4), 531–543.

8. ANHANG

8.1. Vollständige Ergebnisse

Tab. 9: Mittlere Muskelfaserfläche [μm^2].

N = Anzahl Proben. \bar{x} = arithmetisches Mittel.

SD = Standardabweichung. SEM = Standardfehler.

t=T-Test. U= U-Test. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. - = nicht normalverteilt.

	Alle Fasern		Fasertyp I		Fasertyp IIa		Fasertyp IIx	
	Tu+K-	Tu+K+	Tu+K-	Tu+K+	Tu+K-	Tu+K+	Tu+K-	Tu+K+
N	9	6	9	6	9	6	8	3
\bar{x}	2574	3297	1920	2991	3165	3848	3232	2452
SD	825	1320	681	1551	1248	1919	1748	914
SEM	275	538	227	633	416	783	618	527
t	0,123		0,096		-		0,261	
U	0,173		0,079		0,319		0,270	

Tab. 10: Faserdichte [Anzahl Fasern/ mm^2 Gesamtfläche].

N = Anzahl Proben. \bar{x} = arithmetisches Mittel.

SD = Standardabweichung. SEM = Standardfehler.

t=T-Test. U= U-Test. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. - = nicht normalverteilt.

	Alle Fasern		Fasertyp I		Fasertyp IIa		Fasertyp IIx	
	Tu+K-	Tu+K+	Tu+K-	Tu+K+	Tu+K-	Tu+K+	Tu+K-	Tu+K+
N	9	5	9	5	9	5	9	5
\bar{x}	329,68	268,92	146,96	113,87	130,26	128,97	52,46	26,08
SD	96,88	98,48	54,91	40,92	52,00	97,12	44,45	27,12
SEM	32,29	44,04	18,30	18,30	17,33	43,43	14,82	12,13
t	0,161		0,148		0,488		0,143	
U	0,320		0,159		0,369		0,419	

Tab. 11: Faserkomposition [%].

N = Anzahl Proben. \bar{x} = arithmetisches Mittel.

SD = Standardabweichung. SEM = Standardfehler.

t=T-Test. U= U-Test. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. - = nicht normalverteilt.

	Alle Fasern		Fasertyp I		Fasertyp IIa		Fasertyp IIx	
	Tu+K-	Tu+K+	Tu+K-	Tu+K+	Tu+K-	Tu+K+	Tu+K-	Tu+K+
N			9	6	9	6	9	6
\bar{x}			46	50	39	42	15	7
SD			17	22	12	22	11	8
SEM			6	9	4	9	4	3
t			0,355		0,376		-	
U			0,362		0,407		0,419	

Tab. 12: Anteil der Muskelfaserfläche an der Gesamtfläche [%].

N = Anzahl Proben. \bar{x} = arithmetisches Mittel.

SD = Standardabweichung. SEM = Standardfehler.

t=T-Test. U= U-Test. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. - = nicht normalverteilt.

	Alle Fasern		Fasertyp I		Fasertyp IIa		Fasertyp IIx	
	Tu+K-	Tu+K+	Tu+K-	Tu+K+	Tu+K-	Tu+K+	Tu+K-	Tu+K+
N	9	5	9	5	9	5	9	5
\bar{x}	78,5	80,0	28,7	36,2	36,0	37,9	13,7	5,8
SD	11,1	4,0	12,1	20,1	10,0	20,6	8,6	5,5
SEM	3,7	1,8	4,0	9,0	3,3	9,2	2,9	2,5
t	0,396		0,218		0,416		0,055	
U	0,369		0,232		0,473		0,077	

Tab. 13: Kapillarkontakte.

N = Anzahl Proben. \bar{x} = arithmetisches Mittel.

SD = Standardabweichung. SEM = Standardfehler.

t=T-Test. U= U-Test. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. - = nicht normalverteilt.

	Alle Fasern		Fasertyp I		Fasertyp IIa		Fasertyp IIx	
	Tu+K-	Tu+K+	Tu+K-	Tu+K+	Tu+K-	Tu+K+	Tu+K-	Tu+K+
N	9	6	9	6	9	6	8	3
\bar{x}	1,74	2,31	1,75	2,44	1,821	1,951	1,678	1,424
SD	0,80	0,69	0,76	0,85	0,838	0,858	1,003	0,340
SEM	0,27	0,28	0,25	0,35	0,28	0,35	0,35	0,20
t	0,106		0,075		0,395		0,353	
U	0,097		0,097		0,362		0,380	

Tab. 14: Kapillardichte [Anzahl/mm²].N = Anzahl Proben. \bar{x} = arithmetisches Mittel.

SD = Standardabweichung. SEM = Standardfehler.

t=T-Test. U= U-Test. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. - = nicht normalverteilt.

	Pro Gesamtfläche		Pro Faserfläche		Pro Fasern	
	Tu+K-	Tu+K+	Tu+K-	Tu+K+	Tu+K-	Tu+K+
N	9	5	9	6	9	6
\bar{x}	350,55	373,85	445,32	448,07	1,11	1,29
SD	104,65	150,47	107,58	196,51	0,37	0,44
SEM	34,88	67,29	35,86	80,23	0,12	0,18
t	0,379		0,487		0,22	
U	0,369		0,453		0,28	

Tab. 15: Faserfläche pro Kapillarkontakt [μm^2].N = Anzahl Proben. \bar{x} = arithmetisches Mittel.

SD = Standardabweichung. SEM = Standardfehler.

t=T-Test. U= U-Test. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. - = nicht normalverteilt.

	Alle Fasern		Fasertyp I		Fasertyp IIa		Fasertyp IIx	
	Tu+K-	Tu+K+	Tu+K-	Tu+K+	Tu+K-	Tu+K+	Tu+K-	Tu+K+
N	9	6	9	6	9	6	8	3
\bar{x}	1717	1407	1195	1160	2010	2133	2656	1697
SD	697	248	376	200	1005	802	2377	310
SEM	232	101	125	81	335	327	840	179
t	0,138		0,425		0,409		-	
U	0,278		0,407		0,278		0,419	

Tab. 16: Prozentuale Anteil der Fasern mit zentralisierten Zellkernen an allen Fasern, an Fasertyp I, IIa oder IIx [%].

N = Anzahl Proben. \bar{x} = arithmetisches Mittel.

SD = Standardabweichung. SEM = Standardfehler.

t=T-Test. U= U-Test. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. - = nicht normalverteilt.

	Alle Fasern		Fasertyp I		Fasertyp IIa		Fasertyp IIx	
	Tu+K-	Tu+K+	Tu+K-	Tu+K+	Tu+K-	Tu+K+	Tu+K-	Tu+K+
N	9	6	9	6	9	6	8	3
\bar{x}	13,15	18,22	5,16	12,47	18,55	24,62	18,55	22,92
SD	5,61	6,91	4,44	8,44	7,94	12,06	14,83	32,41
SEM	1,87	2,82	1,48	3,44	2,65	4,92	5,24	18,71
t	0,085		0,031*		-		-	
U	0,119		0,159		0,258		0,067	

Tab. 17: Prozentuale Anteil der Fasern des Fasertyps I, IIa, IIx mit zentralisierten Zellkernen an allen ausgewerteten Fasern [%].

N = Anzahl Proben. \bar{x} = arithmetisches Mittel.

SD = Standardabweichung. SEM = Standardfehler.

t=T-Test. U= U-Test. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. - = nicht normalverteilt.

	Alle Fasern		Fasertyp I		Fasertyp IIa		Fasertyp IIx	
	Tu+K-	Tu+K+	Tu+K-	Tu+K+	Tu+K-	Tu+K+	Tu+K-	Tu+K+
N			9	6	9	6	9	6
\bar{x}			2,45	7,08	7,34	9,11	3,36	2,04
SD			1,85	6,45	3,67	3,33	3,70	4,55
SEM			0,62	2,63	1,22	1,36	1,23	1,86
t			-		0,1960		-	
U			0,1957		0,1444		0,0668	

Tab. 18: Prozentuale Anteil der Fasern des Fasertyps I, IIa, IIx mit zentralisierten Zellkernen an allen Fasern mit zentralisierten Zellkernen [%].

N = Anzahl Proben. \bar{x} = arithmetisches Mittel.

SD = Standardabweichung. SEM = Standardfehler.

t=T-Test. U= U-Test. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. - = nicht normalverteilt.

	Alle Fasern		Fasertyp I		Fasertyp IIa		Fasertyp IIx	
	Tu+K-	Tu+K+	Tu+K-	Tu+K+	Tu+K-	Tu+K+	Tu+K-	Tu+K+
N			9	6	9	6	9	6
\bar{x}			21,31	36,29	56,81	56,66	21,88	7,05
SD			16,20	28,11	19,77	26,26	19,54	15,77
SEM			5,4	11,48	6,59	10,72	6,51	6,44
t			0,1229		-		-	
U			0,4150		0,4765		0,1587	

Tab. 19: Auswertung ASA [nmol/mg].

N = Anzahl Proben. \bar{x} = arithmetisches Mittel.

SD = Standardabweichung. SEM = Standardfehler.

t=T-Test. U= U-Test. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. - = nicht normalverteilt.

	N		\bar{x}		SD		SEM		t	U
	Tu+K-	Tu+K+	Tu+K-	Tu+K+	Tu+K-	Tu+K+	Tu+K-	Tu+K+		
Alanin	18	12	20,99	19,25	6,98	5,62	1,65	1,62	0,246	0,277
Ammonium	18	11	45,87	20,87	45,18	11,25	10,65	3,39	-	0,096
Arginin	16	13	4,43	4,78	1,13	1,73	0,28	0,48	0,264	0,228
Asparagin	18	11	2,26	1,98	0,86	0,44	0,20	0,13	0,136	0,250
Aspartat	19	11	6,56	9,41	3,49	2,48	0,80	0,75	0,015*	0,008**
Carnosin	18	13	38,87	38,93	15,35	19,66	3,62	5,45	0,496	0,468
Cystin	18	12	2,30	1,43	2,47	1,09	0,58	0,32	-	0,483
Glutamin	19	12	76,77	75,43	34,88	14,13	8,00	4,08	0,443	0,452
Glutaminsäure	15	13	4,03	5,81	2,33	3,55	0,60	0,98	-	0,103
Glycin	18	11	11,86	10,19	2,39	2,36	0,56	0,71	0,045*	0,053
Histidin	17	13	2,91	3,47	0,75	0,99	0,18	0,27	0,050	0,034*
Isoleucin	16	10	0,95	0,93	0,54	0,18	0,14	0,06	0,444	0,099
Leucin	16	13	2,56	2,04	0,66	0,61	0,16	0,17	0,022*	0,030*
Lysin	18	13	8,69	10,35	2,93	3,09	0,69	0,86	0,076	0,075
Methionin	18	13	0,29	0,22	0,21	0,16	0,05	0,04	0,157	0,132
Ornithin	16	13	3,25	3,33	1,50	1,78	0,37	0,49	0,452	0,430
Serin	18	12	5,51	5,03	1,66	1,03	0,39	0,30	0,198	0,211
Taurin	18	13	41,81	40,79	15,63	9,93	3,68	2,75	0,421	0,421
Threonin	17	12	5,58	4,38	1,24	0,71	0,30	0,20	0,003**	0,004**
Valin	19	10	2,35	2,07	1,13	0,31	0,26	0,10	0,168	0,445

Tab. 20: Auswertung relative Genexpression [x-fach].

N = Anzahl Proben. \bar{x} = arithmetisches Mittel.

SD = Standardabweichung. SEM = Standardfehler.

t=T-Test. U= U-Test. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. - = nicht normalverteilt.

	N		\bar{x}		SD		SEM		t	U
	Tu+K-	Tu+K+	Tu+K-	Tu+K+	Tu+K-	Tu+K+	Tu+K-	Tu+K+		
ACTB	8	11	0,042	0,078	0,042	0,055	0,015	0,017	0,079	0,093
TBP	9	11	0,028	0,041	0,024	0,038	0,008	0,012	0,209	0,455
RPLP0	8	11	0,016	0,031	0,013	0,024	0,005	0,007	-	0,124
BAX	9	11	1,0	0,902	0,506	0,302	0,169	0,091	0,309	0,395
BCL2	8	9	1,0	0,488	0,576	0,231	0,204	0,077	0,028*	0,013*
CASP3	8	10	1,0	1,168	0,134	0,406	0,047	0,129	0,134	0,124
CD68	9	11	1,0	1,483	0,495	0,590	0,165	0,178	0,040*	0,037*
FBXO32	9	10	1,0	0,487	0,992	0,502	0,331	0,159	-	0,164
GDF15	11	9	1,0	1,503	0,397	1,473	0,120	0,491	-	0,455
GCS	16	10	1,0	0,831	0,294	0,143	0,073	0,045	0,036*	-
GSR	15	10	1,0	0,657	0,509	0,253	0,132	0,080	-	0,026*
IL1B	7	9	1,0	2,406	0,735	2,462	0,278	0,821	-	0,093
IL6	8	9	1,0	4,408	1,066	6,564	0,377	2,188	-	0,350
IL8	8	9	1,0	10,00	0,467	16,419	0,165	5,473	-	0,386
KDR	9	10	1,0	1,002	0,288	0,289	0,096	0,091	0,495	0,435
LAT1	14	9	1,0	1,822	0,841	1,592	0,225	0,531	-	0,074
MAOA	9	10	1,0	0,188	1,065	0,090	0,355	0,028	-	0,030*
MAOB	8	11	1,0	1,403	0,341	0,536	0,121	0,162	0,047*	0,029*
MMP9	8	9	1,0	1,333	0,767	1,108	0,271	0,369	0,257	0,250
NOTCH2	8	9	1,0	1,098	0,621	0,427	0,219	0,142	0,362	0,221
PAX7	14	10	1,0	1,225	0,418	0,698	0,112	0,221	0,178	-
PPARGC1A	9	10	1,0	0,794	0,422	0,405	0,141	0,128	0,159	0,164
PTGS2	6	7	1,0	2,811	0,721	3,668	0,294	1,387	-	0,334
SNAT2	14	10	1,0	1,782	0,782	0,990	0,209	0,313	-	0,013*
SOCS3	8	9	1,0	2,313	0,760	3,356	0,269	1,119	-	0,500
TNF	8	11	1,0	2,799	0,490	3,541	0,173	1,068	-	0,310
TRIM63	8	10	1,0	1,389	0,510	0,890	0,180	0,281	0,158	0,187

Tab. 20: Auswertung relative Genexpression [x-fach]. Fortsetzung.

	N		\bar{x}		SD		SEM		t	U
	Tu+ K-	Tu+ K+	Tu+K-	Tu+K+	Tu+K-	Tu+K+	Tu+K-	Tu+K+		
VEGFA	9	10	1,0	0,958	0,283	0,433	0,094	0,137	0,409	0,257
VEGFB	9	10	1,0	0,896	0,415	0,225	0,138	0,071	0,262	0,403

Tab. 21: Protein-Array Auswertung.

Tu+K-/+ und Tu+K+ zeigen die x-fache Veränderung der Proteinexpression zu Tu+K-. Tu+K- ist auf 1 gesetzt.

	Tu+K-/+	Tu+K+
Reference Spots 1	1,2713	1,1507
Serpin E1	1,4241	0,7838
Myeloperoxidase	1,4083	0,8348
Leptin	1,1496	0,9159
IL-19	1,1291	1,0528
IL-4	1,2692	1,0237
GRO-α	1,5373	1,1845
Reference Spots 2	1,1444	1,1393
SHBG	0,9753	1,1259
Osteopontin	0,8413	0,8628
LIF	1,0765	0,8680
IL-22	1,0415	0,9723
IL-5	1,0636	1,0078
Growth Hormone	1,0483	0,9776
ENA-78	1,7814	1,7807
CD40 ligand	2,2388	2,0775
Adiponectin	1,9533	2,3390
Vit D BP	0,8704	1,1548
ST2	1,2819	0,7488
PDGF-AA	1,0429	1,1729
Lipocalin-2	1,5690	1,0502
IL-23	1,3171	1,3586
IL-6	1,5842	1,4964
HGF	1,2931	1,3266
Endoglin	1,8070	1,6401
Chitinase 3-like 1	1,4581	1,3462
Aggrecan	1,3713	1,1066
TARC	1,2552	1,2211
PDGF-AB/BB	0,9550	1,1124

Tab. 21: Protein-Array Auswertung. Fortsetzung.

	Tu+K-/+	Tu+K+
MCP-1	3,9619	1,0644
IL-24	1,5863	1,4071
IL-8	3,7079	1,4841
ICAM-1	1,3175	1,2946
Fas-Ligand	2,0857	2,3155
Complement Factor D	1,2144	1,0748
Angiogenin	0,8228	0,8962
TFF3	2,3115	0,8732
Pentraxin-3	0,8174	0,6389
MCP-3	1,3197	1,3252
IL-27	1,2921	1,3753
IL-10	1,1996	1,3345
FN-γ	1,1331	1,1409
FGF basic	1,3648	1,3834
C-Reactive Protein	1,5824	1,5498
Angiopoietin-1	1,9317	2,0656
TfR	0,9020	0,7116
PF4	0,2926	0,1617
M-CSF	1,2749	1,1819
IL-31	1,3544	1,6957
IL-11	1,1742	1,3947
IGFBP-2	1,0287	0,6804
FGF-7	1,4062	1,5861
Cripto-1	1,5369	1,6782
Angiopoietin-2	1,4077	1,7680
TGF-α	1,1972	0,9698
RAGE	1,72	0,7100
MIF	1,4020	0,6234
IL-32$\alpha/\beta/\gamma$	1,4153	3,0337
IL-12 p70	1,5156	1,4265

Tab. 21: Protein-Array Auswertung. Fortsetzung.

	Tu+K-/+	Tu+K+
IGFBP-3	1,2385	0,0109
FGF-19	1,2651	1,3564
Cystatin C	1,1336	1,2410
TNFSF13B	1,5344	1,6810
Thrombospondin-1	1,1442	1,1339
RANTES	0,6536	0,5236
MIG	1,3591	1,1073
IL-33	1,2395	1,3530
IL-13	1,4917	1,5675
IL-1α	1,2563	1,3753
Flt-3 Ligand	1,4493	1,5930
Dkk-1	1,4441	1,4339
BDNF	1,5764	1,5786
TNF-alpha	1,8627	1,8694
RBP4	0,8687	0,3963
MIP-1α/MIP-1β	1,2522	1,0554
IL-34	1,2575	1,2371
IL-15	1,3170	1,3995
IL-1β	1,2926	1,4089
G-CSF	1,7906	1,9087
DPPIV	15104	1,8021
Complement Component C5/C5a	1,1589	1,0064
uPAR	1,2823	0,8754
Relaxin-2	1,3305	0,8320
MIP-3α	1,3522	1,0918
IP-10	1,2311	1,1360
IL-16	1,3079	0,9670
IL-1ra	1,3470	1,0828
GDF-15	1,2875	1,3925
EGF	1,6111	1,8866

Tab. 21: Protein-Array Auswertung. Fortsetzung.

	Tu+K-/+	Tu+K+
CD14	1,2660	1,0503
VEGF	1,5537	1,2987
Resistin	1,0530	1,0370
MIP-3β	1,1410	1,2270
I-TAC	1,1520	1,4094
IL-17A	1,2840	1,4439
IL-2	1,3923	1,4815
GM-CSF	1,4606	1,7762
EMMPRIN	1,0789	0,8493
CD30	0,9757	0,9528
SDF-1α	0,9886	0,9579
MMP-9	1,2478	1,3512
Kallikrein 3	1,1702	1,3939
IL-18	1,3153	1,6051
IL-3	1,2251	1,5291
Reference Spots 3	0,9990	0,8945

Tab. 22: Korrelationen.

GWV=Gewichtsverlust; FG=mittlere Muskelfaserfläche; KK=Kapillarkontakte;
 ZK=Anteil Fasern mit zentralisierten Zellkernen; Threo.=Threonin;
 TRIM=TRIM63; FBX=FBXO32; SNAT=SNAT2.

	FG	KK	ZK	Leucin	Threo.	CD68	Trim	FBX	SNAT	LAT1
GWV										
r	0,489	0,447	0,527	-0,374	-0,269	0,413	0,276	-0,308	0,324	0,220
N	15	15	15	29	29	20	18	19	24	24
p	0,065	0,095	0,043	0,046	0,158	0,070	0,268	0,200	0,122	0,301
FG										
r		0,821	0,110	0,106	-0,16	-0,258	0,462	-0,062	0,346	-0,040
N		15	15	14	13	11	9	10	10	11
p		0,000	0,696	0,718	0,602	0,444	0,211	0,865	0,327	0,908
KK										
r			0,147	-0,127	-0,051	-0,234	0,58	-0,042	0,282	0,012
N			15	14	13	11	9	10	10	11
p			0,110	0,665	0,868	0,489	0,102	0,909	0,429	0,972
ZK										
r				-0,137	-0,280	-0,191	0,234	-0,233	0,287	0,047
N				14	13	11	9	10	10	11
p				0,641	0,354	0,573	0,544	0,518	0,422	0,890
Leucin										
r					0,234	-0,109	0,682	0,177	-0,169	-0,111
N					28	17	15	16	23	22
p					0,230	0,677	0,005	0,511	0,441	0,622
Threo.										
r						-0,253	-0,424	-0,264	-0,155	-0,223
N						16	14	15	23	21
p						0,344	0,130	0,341	0,481	0,332
CD68										
r							0,166	0,157	-0,457	0,095
N							18	19	15	15
p							0,511	0,520	0,087	0,737
TRIM										
R								-0,194	0,258	-0,046
N								18	13	13
P								0,440	0,395	0,882
FBX										
r									-0,465	-0,219
N									14	14
P									0,093	0,453
SNAT										
r										0,625
N										22
P										0,002

9. VERZEICHNIS MEINER AKADEMISCHEN LEHRER

Meine akademischen Lehrer und Lehrerinnen waren in alphabetischer Reihenfolge folgende Damen und Herren:

In Marburg:

Barth	Donner-	Grundmann	Konrad
Bartsch	Banzhoff	Henke	Lill
Basler	Dornow	Hertl	Löffler
Bauer	Duda	Hilt	Lohoff
Baum	Eberhart	Höffken	Lüers
Baumann	Efe	Hofmann	Lüsebrink
Becker	Eickmann	Holst	Mahnke
Bender	Ellenrieder	Homberg	Maier
Berger	Engenhart-	Hoyer	Maisch
Bette	Cabillic	Hundt	Maisner
Bien	Exner	Jaques	Milani
Bohlender	Fendrich	Jerrentrup	Mittag
Bösner	Feuser	Kann	Moll
Braun	Fuchs-	Kill	Mueller
Brehm	Winkelmann	Kinscherf	Müller-
Cetin	Garten	Kirchner	Brüsselbach
Czubayko	Görg	Klose	Mutters
Daut	Gress	Klug	Neubauer
Decher	Greulich	Knipper	Neumüller
Dodel	Grosse	König	Nimphius

Nimsky	Richter	Schoner	Strik
Oertel	Riera-	Schütz	Suske
Oliver	Knorrenschild	Schwarz	Tackenberg
Opitz	Riße	Seifart	Vogelmeier
Pagenstecher	Roelke	Seitz	Vogt
Pfützner	Rohde	Sekundo	Wagner
Plant	Ruchholtz	Sevinc	Wagner-Praus
Preisig-Müller	Sahmland	Sölter	Weihe
Pucetti	Schachtner	Sommer	Werner
Reese	Schäfer	Stahl	Westermann
Reiter	Schieffer	Steiniger	Wilhelm
Renz	Schmidt	Stief	Wulf
Rey	Schneider	Stiewe	Zemlin
	Schöller		

In Fulda:

Benöhr	Haubitz	Plappert	Schächinger
--------	---------	----------	-------------

In Bern:

Bär	Gurtner	Henle	Schwab
Eggli	Heigl	Kleinschmidt	Thalmann
Flückinger	Heini	Nötzli	Urfer
Gubler	Heitkemper	Nyffeler	Wyss